



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Ciencias Biológicas

Escuela Profesional de Microbiología y Parasitología

**Evaluación de partículas magnéticas como soporte de anticuerpos monoclonales en pruebas de detección de antígenos en orina: modelo de neurocisticercosis humana**

**TESIS**

Para optar el Título Profesional de Bióloga Microbióloga  
Parasitóloga

**AUTOR**

Cindy ESPINOZA GUERRERO

**ASESOR**

Dr. Juan Atilio JIMÉNEZ CHUNGA

Lima, Perú

2019



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

## Referencia bibliográfica

---

Espinoza, C. (2019). *Evaluación de partículas magnéticas como soporte de anticuerpos monoclonales en pruebas de detección de antígenos en orina: modelo de neurocisticercosis humana*. Tesis para optar el título profesional de Bióloga Microbióloga Parasitóloga. Escuela Profesional de Microbiología y Parasitología, Facultad de Ciencias Biológica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.

---



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**  
Universidad del Perú. Decana de América

Vicerrectorado de Investigación y Posgrado  
Dirección General de Biblioteca y Publicaciones



Dirección del Sistema de Bibliotecas y Biblioteca Central

"Año de la lucha contra la corrupción y la impunidad"

### **Hoja de metadatos complementarios**

Código ORCID del autor (dato opcional):

Código ORCID del asesor o asesores (dato obligatorio): 0000-0002-0128-3028

DNI del autor: 46069898

Grupo de investigación: Cysticercosis working group in Peru

Institución que financia parcial o totalmente la investigación: CONCYTEC-FONDECYT

Ubicación geográfica donde se desarrolló la investigación. Debe incluir localidades y/o coordenadas geográficas: País: Perú, Ciudad: Lima, Distrito: San Martín de Porres. Coordenadas: Latitud: -12.0303, Longitud: -77.0572, Latitud: 12° 1' 49" Sur, Longitud: 77° 3' 26" Oeste.

Año o rango de años que la investigación abarcó: 2016- 2018



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**  
(Universidad del Perú, Decana de América)

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**ACTA DE SESIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE  
BIÓLOGA MICROBIÓLOGA PARASITÓLOGA  
(MODALIDAD: SUSTENTACIÓN DE TESIS)**

Siendo las 16:09 horas del 09 de octubre de 2019, en el Salón de Grados de la Facultad de Ciencias Biológicas y en presencia del jurado formado por los profesores que suscriben, se dio inicio a la sesión para optar al **Título Profesional de Bióloga Microbióloga Parasitóloga** de **CINDY ESPINOZA GUERRERO**.

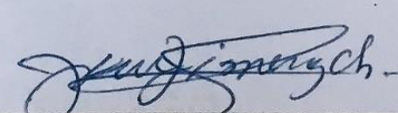
Luego de dar lectura y conformidad al expediente N° **023-EPMP-2019**, el titulando expuso su tesis: **“EVALUACIÓN DE PARTÍCULAS MAGNÉTICAS COMO SOPORTE DE ANTICUERPOS MONOCLONALES EN PRUEBAS DE DETECCIÓN DE ANTÍGENOS EN ORINA: MODELO DE NEUROCISTICERCOSIS HUMANA”**, y el Jurado efectuó las preguntas del caso calificando la exposición con la nota ...19..., calificativo: Aprobado con maximos honores...

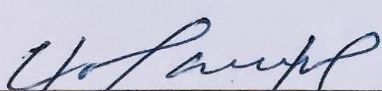
Finalmente, el expediente será enviado a la Escuela Profesional de Microbiología y Parasitología, y al Consejo de Facultad para que se apruebe otorgar el **Título Profesional de Bióloga Microbióloga Parasitóloga** a **CINDY ESPINOZA GUERRERO** y se eleve lo actuado al Rectorado para conferir el respectivo título, conforme a ley.

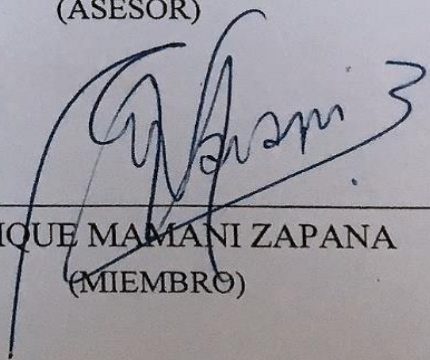
Siendo las 17:40 horas se levantó la sesión.

Ciudad Universitaria, 09 de octubre de 2019.

  
Mg. ROSA MARTINEZ ROJAS  
(PRESIDENTA)

  
Dr. JUAN JIMENEZ CHUNGA  
(ASESOR)

  
Mg. ERASMO COLONA VALLEJOS  
(MIEMBRO)

  
Dr. ENRIQUE MAMANI ZAPANA  
(MIEMBRO)

*Dedicado a mis queridos padres Santos e Hilda, quienes a pesar de su humildad y todas las adversidades supieron inculcarme y brindarme el apoyo incondicional para lograr mis metas profesionales.*

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Hugo García, por la oportunidad que me brindó en su grupo de investigación.

Al Dr. Javier Bustos por la coordinación, asesoría y administración del proyecto de investigación que permitió desarrollar mi tema de tesis.

A la M.Sc. Helena Jahuirá, mi asesora externa, quien me brindó su apoyo incondicional en el desarrollo experimental de mi tesis.

Al Dr. Juan Jiménez, mi asesor interno, quien me brindó su apoyo en las correcciones y los tramites de mi tesis.

A la PhD (c) Yagahira Castro, por su apoyo en la evaluación de los experimentos de mi tesis y principal investigadora del proyecto.

A la M.Sc. Yesenia Castillo, quien me abrió las puertas del laboratorio que coordina, por sus enseñanzas y consejos.

A mis compañeros y amigos tesistas del grupo de investigación del proyecto “Biosensor” Yesica, Luz, Águeda y Kevin con quienes compartimos gratos momentos en el laboratorio.

A mis padres, Santos e Hilda, mis hermanas Liz y Katherine, y mi sobrino Sebastián por su apoyo moral y cariño incondicional.

## ABREVIATURAS

NCC: Neurocisticercosis

mAbs: Anticuerpos monoclonales

IgM: Inmunoglobulina isotipo IgM

ELISA: Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima

ROC: Característica operativa del receptor

LCR: Líquido cefalorraquídeo

SNC: Sistema nervioso central

TAC: Tomografía Axial Computarizada

RM: Resonancia magnética

TsmAbs: Anticuerpos monoclonales anti *Taenia solium*

Buffer MES: Ácido 2-Morfolinoetanosulfónico

EITB: Electro Inmuno Transferencia Blot

SDS-PAGE: Sodium Dodecyl Sulfate – Polyacrylamide Gel Electrophoresis

PBS: Phosphate-buffered saline

Pool de orina: Combinación de varias muestras de orina, ya sea de pacientes diagnosticados positivos a la infección (pool positivo), o de pacientes sanos (pool negativo)



## ÍNDICE GENERAL

	Página
ABREVIATURAS.....	i
RESUMEN.....	ii
ABSTRACT.....	iii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. MARCO TEÓRICO.....	2
2.1. Biología de <i>Taenia solium</i> .....	3
2.1.1. Morfología.....	3
2.1.2. Ciclo biológico .....	4
2.2. Aspectos clínicos y epidemiológicos de la neurocisticercosis humana .....	5
2.3. Inmunología.....	8
2.3.1. Componentes antigénicos de <i>T. solium</i> .....	8
2.3.2. Respuesta inmunológica en la neurocisticercosis humana .....	10
2.4. Diagnóstico de la neurocisticercosis humana .....	11
2.4.1. Diagnóstico por imagen .....	11
2.4.2. Diagnóstico serológico .....	12
2.5. Partículas magnéticas .....	16
III. HIPÓTESIS.....	22
IV. OBJETIVOS .....	23
V. MATERIAL Y MÉTODOS .....	24
VI. RESULTADOS.....	33
VII. DISCUSIÓN .....	40
VIII. CONCLUSIONES .....	43
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	44
X. ANEXOS .....	52

## RESUMEN

La cisticercosis es una infección provocada por las larvas de *Taenia solium* que se produce cuando el hombre se convierte en el hospedero intermediario accidental. Cuando los cisticercos invaden el sistema nervioso condicionan una enfermedad pleomórfica denominada neurocisticercosis. La sospecha clínica y epidemiológica es importante pero el diagnóstico se realiza primariamente por medio de pruebas imagenológicas y como prueba confirmatoria se utilizan las pruebas serológicas. Este estudio tiene como objetivo evaluar las partículas magnéticas epoxy y ácido carboxílico como soporte de unión a anticuerpos monoclonales para pruebas de detección de antígenos en NCC humana. Se logró la optimización de un inmunoensayo basado en partículas magnéticas ácido carboxílico, lo cual permitió la evaluación de 64 muestras de orina de pacientes diagnosticados con NCC subaracnoidea, NCC calcificada y de voluntarios sanos. Para la determinación del punto de corte del inmunoensayo se emplearon curvas ROC. Para el grupo NCC subaracnoidea se obtuvo a partir de la curva ROC un óptimo punto de corte de 0.164, una sensibilidad de 100% y una especificidad de 100%, mientras que para el grupo NCC calcificada se obtuvo a partir de la curva ROC un óptimo punto de corte de 0.076, una sensibilidad de 70.37% y una especificidad de 42.86%. El inmunoensayo basado en partículas magnéticas permitió una buena captación de positivos, además se logró detectar antígeno circulante en 4 de los 27 pacientes con NCC calcificada. Esto indica que la prueba puede ser usada para discernir entre positivos y negativos con niveles bajos de antígenos excretados en la orina.

**Palabras clave:** Neurocisticercosis calcificada, Neurocisticercosis subaracnoidea, Partículas magnéticas, ELISA, orina.

## ABSTRACT

Cysticercosis is an infection caused by *Taenia solium* larvae that occur when man becomes the accidental intermediary. When cyst invades the nervous system they have a pleomorphic disease for neurocysticercosis. Clinical and epidemiological suspicion is important, but the diagnosis is made primarily by means of imaging and serological tests are used as a confirmatory test. This study aims to evaluate the types of magnetic particles as the support of the binding to monoclonal antibodies for antigen detection tests in human NCC. We verified the optimization of an immunoassay based on magnetic beads, and the evaluation of 64 urine samples from patients diagnosed with subarachnoid NCC, calcified NCC and healthy volunteers. The ROC curves will be used to determine the immunoassay cut-off point. For the subarachnoid NCC group, an optimum cut-off point of 0.164 was obtained from the ROC curve, a sensitivity of 100% and a specificity of 100%, while for the calcified NCC group a better result was obtained from the ROC curve. Cut point of 0.076, a sensitivity of 70.37% and a specificity of 42.86%. The immunoassay was based on the magnetic particles in a good uptake of positive results, in addition to a circulating antigen found in 4 of the 27 patients with calcified NCC. This indicates that the test can be used to distinguish between positive and negative results with low levels of antigens excreted in the urine.

**Key words:** Calcified NCC, subarachnoid NCC, magnetic particles, ELISA, urine

## I. INTRODUCCIÓN

La cisticercosis es una parasitosis ocasionada por las larvas (*Cysticercus cellulosae*) de *Taenia solium* (*T. solium*). El hombre, hospedero intermediario accidental, adquiere esta enfermedad al ingerir los huevos de *T. solium* excretados por un portador humano del parásito (contaminación fecal-oral) (Del Brutto, 2005). Los principales órganos afectados son el sistema nervioso central (SNC), los ojos y los músculos (Kimura *et al.*, 2010).

La cisticercosis es un problema de salud pública en la mayoría de los países en vías de desarrollo (Latinoamérica, Sudeste Asiático y África). Debido a la inmigración de personas infectadas provenientes de países endémicos, la incidencia de esta parasitosis ha aumentado en los países desarrollados (Saavedra *et al.*, 2010).

El diagnóstico de la neurocisticercosis (NCC) se realiza en primer lugar con la obtención de imágenes cerebrales y requiere de pruebas serológicas para la confirmación de la infección. (García *et al.*, 2014).

En el Perú el Western blot es la principal prueba diagnóstica confirmatoria y ELISA se utiliza como una herramienta para el seguimiento y control del paciente. Estos inmunoensayos son poco sensibles en pacientes con pocos quistes parenquimatosos y en aquellos con NCC calcificada, además puede presentar reacción cruzada en sueros de pacientes con otras infecciones helmínticas (Rodríguez *et al.*, 2009). Con la finalidad de aumentar esta sensibilidad se vienen realizando estudios de detección de antígenos circulantes de *T. solium* mediante el uso anticuerpos monoclonales (mAbs). Los antígenos circulantes están presentes sólo en muestras de pacientes con parásitos viables; cuando el paciente recibe un tratamiento antihelmíntico o es sometido a cirugía las concentraciones antigénicas disminuyen rápidamente (Fleury *et al.*, 2013). En este contexto, la técnica de ELISA podría ser útil para controlar la decaída de la carga del cisticerco como respuesta al tratamiento antiparasitario particularmente en pacientes con NCC subaracnoidea. (Zamora *et al.*, 2005; Rodríguez *et al.*, 2009; Fleury *et al.*, 2013).

Los antígenos circulantes de *T. solium* casi siempre están presentes en pacientes con NCC subaracnoidea basal y racemosa de los espacios subaracnoideos.

Paredes y colaboradores realizaron la producción exitosa de 21 anticuerpos monoclonales (mAbs) contra antígenos de quistes de *T. solium*, los cuales sólo mostraron reacción cruzada con *T. saginata* en algunos casos; sólo 8 anticuerpos monoclonales anti *T. solium* (TsmAbs) fueron capaces de detectar antígenos circulantes del parásito en muestras de sangre y de orina humana (Paredes *et al.*, 2016).

Al ser estos mAbs una alternativa prometedora para el diagnóstico de pacientes con NCC, es necesario continuar con las investigaciones para optimizar su uso e incrementar la especificidad y sensibilidad de los ensayos. Con el surgimiento de la nanotecnología en el inmunodiagnóstico, el uso de partículas magnéticas acopladas a estos mAbs resulta ser una modificación innovadora de las técnicas convencionales, es por ello que en este estudio se desarrolló un prototipo de inmunoensayo basado en el uso de partículas magnéticas en muestras de orina que son no invasivas, de fácil obtención.

Existen una extensa variedad de partículas magnéticas, y su selección es afín al uso requerido, por ejemplo tenemos a aquellas que presentan un núcleo de hierro, el cual le da la propiedad de adhesión a una superficie magnética. Estas partículas a su vez presentan grupos funcionales los cuales mediante enlaces químicos reaccionan con una proteína específica.

Las partículas magnéticas brindan el soporte requerido a los mAbs que permite la detección y concentración de antígenos circulantes de *T. solium* en muestras de orina de pacientes con NCC.

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1. Biología del parásito

*Taenia solium* [Linnaeus, 1758] pertenece al phylum Platyhelminthes, clase Cestoidea, orden Cyclophyllidea, familia Taeniidae. Las tenias son parásitos con ciclos de vida complejos que requieren al menos de dos hospederos para completarlos. En el caso de *T. solium*, el hombre es el hospedero definitivo y el cerdo es el hospedero intermediario. Sin embargo, el hombre se convierte en el hospedero intermediario accidental cuando ingiere los huevos de *T. solium* (Del Brutto *et al.*, 2014.c).

#### 2.1.1. Morfología

##### 2.1.1.1. Adulto:

*T. solium* es un gusano plano de color blanco opaco que mide de 2 a 7 metros de largo; La cabeza o escólex es el órgano de fijación al hospedero que tiene el tamaño de una cabeza de alfiler la cual posee 4 ventosas y un róstelo formado por una doble corona de 22 a 32 ganchos. El resto del gusano presenta la apariencia de un listón formado por proglótidos o segmentos que se desarrollan a partir del cuello que continúa del escólex, llamado en conjunto estróbilo, caracterizados por presentar un crecimiento continuo. Los más cercanos al cuello son inmaduros, posteriormente siguen los proglótidos maduros que tienen desarrollados los órganos sexuales. Los últimos segmentos son grávidos, los cuales presentan las ramas uterinas cargadas de huevos, éstos aparecen a los 3 o 4 meses de infección (Flisser *et al.*, 2005; Montero y Rojas, 2006; Ponce, 2017) (Anexo 1). Las tenias son hermafroditas y carecen de aparato digestivo. Presentan un tegumento que lo recubre y que cumple la función de absorción, digestión, protección y tracción. (Otra *et al.*, 2002; Montero y Rojas, 2006; Ponce, 2017).

##### 2.1.1.2. Huevo:

Los huevos son esféricos y miden entre 20 a 50  $\mu\text{m}$  de diámetro. Están compuestos por varias capas y membranas que le permiten sobrevivir a las condiciones adversas del medio exterior (Laclette *et al.*, 1992; Ponce, 2017). La capa más externa es el vitelo, que

es poco frecuente encontrarlo en huevos expulsados en las heces del portador. La capa que continúa es el embrióforo, el cual está constituido por bloques de proteínas similar a la queratina unidos entre sí por la sustancia cementante que es resistente a los jugos digestivos naturales y artificiales (Montero y Rojas, 2006; Ponce, 2017) (Anexo 2). La capa más interna es la membrana oncosferal que rodea al embrión hexacanto; ésta es impermeable a las condiciones ambientales externas. Cuando el huevo es ingerido por el hospedero definitivo, la membrana oncosferal se pone en contacto con la pancreatina y permite que el embrión expuesto active el movimiento de sus ganchos, salga y se sostenga del epitelio intestinal del hospedero (Flisser *et al.*, 2005; Montero y Rojas, 2006).

Posteriormente, las oncósferas o embriones hexacanto migran a través de la lámina propia intestinal y permanecen en la mucosa intestinal de 15 a 48 horas después de la ingestión de los huevos (Yoshino *et al.*, 1934). Después de penetrar el intestino, el desarrollo post oncosferal conlleva a la formación de los cisticercos o metacéstodos (Ponce, 2017).

#### **2.1.1.3. Cisticerco:**

El cisticerco, larva o *Cysticercus cellulosae* completa su desarrollo entre 177 y 325 días después de la infección, en su etapa inicial el cisticerco estimula la formación de una reacción inflamatoria, la cual inhibe la evaginación del escólex. Los cisticercos presentan dos cámaras: la interna que contiene al escólex y al canal espiral, y la cámara externa que lo rodea y contiene el líquido vesicular (Flisser *et al.*, 2005; Ponce, 2017) (Anexo 3).

#### **2.1.2. Ciclo biológico de *T. solium***

El ciclo se inicia cuando el hombre, hospedero definitivo del estadio adulto de *T. solium*, expulsa los proglótidos grávidos cargados de huevos en conjunto con las heces (Otra *et al.*, 2002). Estos huevos permanecen en el medio exterior hasta ser ingeridos por el hospedero intermediario, normalmente es el cerdo (Correa *et al.*, 1991). La capa externa

del huevo llamada embrióforo es degradada por las enzimas proteolíticas del estómago e intestino del cerdo, liberando y activando al embrión. (White, 1997).

El embrión hexacanto liberado, migra por el torrente sanguíneo, se implanta en el tejido muscular del cerdo, aumenta de tamaño y transcurridas aproximadamente 10 semanas evoluciona a cisticerco (White, 1997; Larralde y Aluja 2006).

El hombre al ingerir la carne de cerdo cruda o mal cocida infectada de cisticercos viables desarrolla la tenia adulta en su intestino delgado. La tenia adulta a partir de los 3 meses empieza a liberar los proglótidos grávidos los que son expulsados a través de las heces del hospedero, completando así el ciclo (Larralde y Aluja 2006; Kyvsgaard *et al.*, 2007).

El hombre puede actuar como hospedero intermediario accidental al ingerir alimentos contaminados con huevo de *T. solium*, afectando principalmente al SNC lo cual conlleva a la enfermedad pleomórfica llamada NCC (Larralde y Aluja 2006) (Anexo 4).

## **2.2. Aspectos clínicos y epidemiológicos de la neurocisticercosis humana**

### **2.2.1. Patología**

Para la supervivencia de los cisticercos en los órganos del hospedero durante semanas o meses y con la finalidad de completar su ciclo biológico, el parásito evade la respuesta inmune del hospedero utilizando herramientas como el mimetismo molecular y la depresión de la inmunidad celular. En el caso de la NCC, la barrera hematoencefálica (BHE), un lugar inmunológicamente privilegiado, favorece la supervivencia del metacéstodo. (Vidal *et al.*, 1989; White, 2000; Imirizaldu *et al.*, 2004).

Pueden pasar de semanas a años para que los cisticercos maduren y pasar desde una etapa de exposición a los síntomas, los cuales aparecen tras la muerte del cisticerco o por el fallo de los mecanismos de evasión del sistema inmune del hospedero generando una reacción inflamatoria (Imirizaldu *et al.*, 2004).

### **2.2.2. Clasificación de la neurocisticercosis**

La NCC se puede clasificar en función a la topografía y al estadio de evolución de las lesiones. En relación con la topografía, se clasifica en cisticercos subaracnoideos,



parenquimatosos, ventriculares y espinales, mientras que según el estadio evolutivo se clasifica en estadio no quístico, vesicular, vesicular-coloidal, nodular-granulomatoso y nodular-calcificado (Estrada *et al.*, 2013).

#### **2.2.2.1. Clasificación topográfica**

##### **✓ Cisticercos subaracnoideos**

Este tipo de lesión es la más frecuente. El cisticerco logra alcanzar por vía hematógena las cisternas basales, espacios subaracnoideos y meninges, desatando una aguda respuesta inflamatoria perilesional. Los quistes subaracnoideos pueden ser pequeños si están localizados entre de los surcos corticales o pueden adquirir un gran tamaño si se encuentran en la cisura de Silvio (Anexo 5) o en las cisternas basales (García *et al.*, 2003b; Estrada *et al.*, 2013).

##### **✓ Cisticercos parenquimatosos**

Es la segunda más frecuente, los quistes se ubican principalmente en la corteza cerebral y en los ganglios basales donde la irrigación vascular es mayor (Anexo 6). Estos quistes en su mayoría son pequeños y en muy escasas ocasiones miden más de 10 mm de diámetro, debido a que la presión que ejerce el parénquima cerebral reprime su desarrollo. La lesión parenquimatosa incluye diferentes etapas evolutivas, ya sean quistes viables (quistes con escólex) o calcificados (Estrada *et al.*, 2013).

##### **✓ Cisticercos ventriculares**

Los cisticercos intraventriculares representan entre el 10 y 20% de todos los casos de NCC. Generalmente se presentan como quistes únicos, pedunculados y se ubican con frecuencia en el IV ventrículo, provocando así el flujo interrumpido del LCR. Cuando la obstrucción es continua, produce hidrocefalia, y cuando es intermitente, puede dar lugar al síndrome de Bruns (Imirizaldu *et al.*, 2004).

##### **✓ Cisticercos espinales**

Los cisticercos espinales son muy raros (1-3% de los casos). Las larvas se desplazan a través del LCR y se ubican en el espacio subaracnoideo que rodea la médula. Aún más extrañas (menos del 1%) son las lesiones espinales intramedulares que, en la mayoría de los casos, se localizan en su segmento dorsal, provocando una mielitis transversa (Palacios *et al.*, 1997; Estrada *et al.*, 2013; Imirizaldu *et al.*, 2004)

#### **2.2.1.1. Clasificación según los estadios evolutivos**

Según su etapa evolutiva y los hallazgos radiológicos, la NCC se divide en 5 estadios: **No quístico:** Es la etapa inicial de la infección, el cisticerco inicia la invasión tisular. Generalmente durante esta etapa no se observan imágenes. (Estrada *et al.*, 2013; Imirizaldu *et al.*, 2004)

**Vesicular:** Durante esta etapa el hospedero presenta tolerancia inmune y una reacción inflamatoria leve. El quiste está rodeado de una pared muy fina, presenta un nódulo mural (escólex) e internamente está repleto de un fluido claro (Estrada *et al.*, 2013; Imirizaldu *et al.*, 2004).

**Vesicular-coloidal:** El sistema inmune del hospedero reacciona contra el parásito por lo que aparece un intenso edema perilesional. En esta etapa el escólex muere por lo que el fluido interior se carga de proteínas lo cual aumenta la atenuación en la tomografía computarizada (Estrada *et al.*, 2013; Imirizaldu *et al.*, 2004).

**Nodular-granulomatoso:** En esta etapa el edema perilesional va disminuyendo progresivamente, la capsula que rodea al quiste se vuelve más gruesa y el escólex inicia su etapa de calcificación. En la tomografía se observa frecuentemente un realce nodular o micronodular, lo que sugiere un granuloma (Estrada *et al.*, 2013; Imirizaldu *et al.*, 2004).

**Nodular-calcificado:** Finalmente el quiste pasa a una etapa involutiva, con escasa reacción inflamatoria. La lesión granulomatosa se contrae hasta una fracción de su tamaño inicial y esta mineralizada. En la tomografía se observa un nódulo calcificado, sin efecto de masa ni captación de contraste (Estrada *et al.*, 2013; Imirizaldu *et al.*, 2004).

### **2.2.3. Epidemiología**

La NCC se ha convertido en una de las principales causas de las enfermedades neurológicas en varios países de América Latina, Asia y África, donde la NCC es endémica (White *et al.*, 1997; Del Brutto., 2014.b). También se reconoce con frecuencia en los países desarrollados debido a la migración de las personas infectadas y, en menor medida, en los viajeros infectados en regiones endémicas (Del Brutto., 2012).

La distribución global de la teniasis y cisticercosis humana incluye regiones endémicas como América Latina, Sur y Sur Este de Asia y África Subsahariana (Anexo 7).

Se estima que más de 50 millones de personas en el mundo sufren de cisticercosis, causando 50 000 muertes por año (Flisser *et al.*, 2005).

El Grupo de Trabajo en Cisticercosis en Perú ha descrito como zonas hiperendémicas para neurocisticercosis toda la sierra, la costa norte y la selva alta, siendo los dos últimos, focos de migración de pobladores de la sierra (Anexo 8) (García *et al.* 2010). Además, se han descrito prevalencias de cisticercosis porcina entre 20 y 42% en zonas endémicas y hasta 75% en zonas hiperendémicas (García *et al.*, 1998).

Estudios serológicos e imagenológicos en zonas endémicas han confirmado la NCC en 30 a 50% de los casos de epilepsia. Esta llega a ser más prevalente en países menos desarrollados; además la seroprevalencia de cisticercosis es mucho más alta en pacientes con afecciones neurológicas que en la población en general (Bern *et al.*, 1999). Se ha estimado que el número de casos de neurocisticercosis sintomática en Perú es de 31 000 y asciende a 400 000 en Latinoamérica (García *et al.*, 2003a). Por otro lado, la teniasis tiene una prevalencia de entre 0.5 a 1% en las áreas endémicas, siendo mayor en jóvenes, mujeres embarazadas y ancianos (García *et al.*, 2010).

## **2.3. Inmunología**

### **2.3.1. Componentes antigénicos de *T. solium***

Debido a los diversos estadios del cisticerco, existe una diversidad de antígenos los cuales poseen la capacidad de inducir una respuesta inmune particular. En la tabla 1 se describen los principales antígenos estudiados. (Yakoleff- Greenhouse *et al.*, 1982; Laclette *et al.*, 1989; Harrison *et al.*, 1989; Obregón-Henao *et al.*, 2003; Larralde y Aluja 2006).

Tabla 1. Antígenos de *Taenia solium* (modificado de Larralde y Aluja 2006)

<b>Tipo de antígeno</b>	<b>Aplicación</b>
<b>Antígeno total</b>	Utilizado para pruebas de detección de anticuerpos en suero, saliva y LCR de pacientes con NCC.  Empleado para la producción de anticuerpos monoclonales.
<b>Fluido vesicular</b> <b>(10KDa, 26KDa, 35KDa y 70KDa)</b>	Utilizados para el estudio de las diferencias antigénicas entre cisticercos de diferentes continentes.  Empleado para la producción de anticuerpos monoclonales.
<b>Oncósfera (TSOL18, TSOL45, 22KDa, 22.5KDa, 31.3KDa, 64KDa y 70KDa).</b>	Antígenos utilizados para la inmunización experimental de cerdos para el control de la cisticercosis porcina.  Utilizados en ensayos de detección de anticuerpos en suero de cerdos con cisticercosis porcina.  Usado en pruebas de ELISA para el diagnóstico de teniasis.
<b>Escólex 13KDa, 17KDa y 26KDa)</b>	Antígeno utilizado en estudios de detección de anticuerpos en suero de pacientes con NCC activa.
<b>Antígenos de secreción (Excretorio Secretorio, HP10, 66KDa, 190KDa y 230KDa)</b>	Antígenos empleados para la producción de anticuerpos monoclonales. Estos mAbs fueron utilizados en pruebas de ELISA de detección de antígenos circulantes.

<b>Glicoproteínas</b>	Utilizados para la detección de anticuerpos en saliva, suero
(Ts18var1, LLGP, GP10, GP13, GP24, GP39-42, GP50, Ag1V1, Ag2, 12KDa, 16KDa, 18KDa, 32KDa, 30KDa, 53KDa, 64KDa, 100KDa y 200KDa)	y LCR de pacientes con NCC y cisticercosis porcina. Aplicados en el diagnóstico de teniasis y casos de exposición al parásito. Glicoproteínas antigénicas utilizadas en el estudio de los diferentes estadios del parásito y del proceso inflamatorio desencadenado durante la infección por <i>Taenia solium</i> .
<b>Antígeno B</b>	Permite la detección de anticuerpos en LCR de pacientes con NCC.

### 2.3.2. Respuesta inmunológica en la neurocisticercosis humana

A pesar de que no se conoce con exactitud el mecanismo de infección de *T. solium*, se postula que las proteínas de superficie y de secreción de las oncósferas cumplen un papel fundamental en la invasión del parásito sobre su hospedero, tal como las lectinas implicadas en el reconocimiento celular y de adhesión de las oncósferas (León *et al.* 2013). Una de las proteínas de superficie de la oncósfera capaz de adherirse a la matriz extracelular de su hospedero favoreciendo su invasividad y activación de la respuesta inmune es la TSOL18 (Zimic *et al.* 2011; León *et al.* 2013).

Las cisteinoproteasas son las proteínas de secreción importantes en el ciclo de vida y patogenicidad del parásito, debido a su estabilidad, su capacidad de activación de enzimas lisosomales y de invasión celular y de tejidos (Sajid y Mckerrow, 2002; León *et al.* 2013).

Una vez establecido el cisticerco se desencadena el fenómeno inflamatorio, donde las citocinas podrían participar en el daño local de los tejidos del SNC, así como el

incremento de las moléculas de adhesión celular (Anexo 9) (Bueno *et al.*, 2004; Larralde y Aluja 2006).

## **2.4. Diagnóstico de la neurocisticercosis humana**

Debido a la heterogeneidad de sus manifestaciones neurológicas, el diagnóstico y la caracterización de la NCC humana se basan en un examen de imágenes cerebrales para observar las características de las lesiones, acompañado de un resultado de prueba serológica para confirmar la etiología (Rodríguez *et al.*, 2012).

### **2.4.1. Diagnóstico por imagen**

La introducción de las técnicas modernas de neuroimagen incrementó considerablemente la precisión diagnóstica de la neurocisticercosis al proporcionar información sobre el número y la topografía de las lesiones, así mismo permitió conocer el grado de reacción inflamatoria del hospedero contra el parásito (Del Brutto y García, 2014).

En la actualidad se usa la tomografía axial computarizada (TAC) y la resonancia magnética (RM) para visualizar la localización, el número y el estadio de los cisticercos (Saavedra *et al.*, 2010).

#### **✓ Tomografía Axial Computarizada (TAC)**

Permite identificar el número y topografía del parásito, sus etapas de viabilidad o involución, así como la clasificación clínica de la neurocisticercosis. Por ejemplo, puede revelar una NCC subaracnoidea con hidrocefalia, quistes intraventriculares y encefalitis cisticercósica (múltiples quistes captadores de contraste en anillo, inflamación y edema, con ventrículos laterales pequeños) (Anexo 10), además de determinar el enfoque terapéutico racional para las diferentes formas de la enfermedad (García y Del Brutto, 2003b).

#### **✓ Resonancia Magnética (RM)**

La RM tiene mayor sensibilidad que la TAC, particularmente para lesiones pequeñas, mostrando imágenes mejor definidas (escólex), quistes intraventriculares (III y IV) en

distintos planos espaciales (Anexo 11). Sin embargo, no detecta bien las calcificaciones y es más costosa que la TAC (García y Del Brutto, 2003b). Otra desventaja de la RM incluye la escasez de equipos en las regiones pobres donde la cisticercosis es endémica y el costo del examen es alto.

#### **2.4.2. Diagnóstico Serológico**

Entre las técnicas inmunodiagnósticas de la NCC destacan el Western blot y el ELISA, como las principales herramientas complementarias para su detección.

##### **2.4.2.1. Western blot (WB)**

También llamado EITB (por su acrónimo en inglés Enzyme-linked Immuno-electro-Transfer blot) o inmunoblot. Esta técnica fue desarrollada en 1989 por Tsang *et al.*, la cual utiliza antígenos glicoproteicos del metacésto de *T. solium* purificados por cromatografía de afinidad con lectina de lentejas (LLGP). El EITB se convirtió rápidamente en la prueba de elección para el diagnóstico serológico de la NCC.

La LLGP-EITB combina la especificidad de usar antígenos previamente purificados, la capacidad de resolución de la electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio y la sensibilidad de la inmunodetección basada en enzimas. Esta técnica detecta anticuerpos dirigidos contra siete glicoproteínas antigénicas (GP) de un homogeneizado de metacésto: GP50, GP42-39, GP24, GP21, GP18, GP14 y GP13, donde los números se refieren a su masa molecular en KDa (Anexo 12). La presencia de cualquiera de las siete bandas de anticuerpos define una prueba positiva, con una sensibilidad y especificidad iniciales reportadas de 98 y 100%, respectivamente. (Tsang *et al.*, 1989) (Rodríguez *et al.*, 2012).

Las técnicas de detección de anticuerpos en general no tienen la capacidad de distinguir entre exposición, infección activa o inactiva, además tienen un valor predictivo positivo bajo en casos de cisticercosis viable (debido a reacciones de anticuerpos positivas en individuos con cisticercos calcificados y un alto antecedente de seroprevalencia en la

población general en áreas endémicas) Cabe mencionar que presentan una sensibilidad baja en pacientes con quiste único (Singh *et al.*, 1999). Aunque el LLGP-EITB actualmente se considera la prueba de elección para el diagnóstico serológico de la cisticercosis, tiene sus propios inconvenientes, que incluyen la fuente de antígeno (el método requiere quistes frescos de cerdos infectados), y también es un procedimiento complicado. Por lo tanto, los esfuerzos de investigación más recientes se han centrado en la caracterización y síntesis o producción de formas recombinantes de los siete antígenos de diagnóstico para producir ensayos más simples y más reproducibles (Rodríguez *et al.*, 2012).

#### **2.4.2.2. ELISA directo**

La técnica de ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) de tipo directo permite la detección de productos del agente infeccioso en el hospedero, demostrando así una infección activa en donde los niveles de antígeno están asociados con la carga infecciosa y, por lo tanto, con la gravedad de la infección. Este tipo de prueba puede ser utilizada para determinar decisiones terapéuticas y orientar el pronóstico de los pacientes. La cura se asocia frecuentemente con resultados negativos de antígenos y, por otro lado, las recaídas, reinfecciones o complicaciones resultan en un aumento de los niveles de antígeno circulante.

Desafortunadamente, en la mayoría de los casos, la sensibilidad de los ensayos de detección de antígenos es inferior a la de los ensayos indirectos de detección de anticuerpos (Rodríguez *et al.*, 2012).

Los primeros ensayos de ELISA para la detección de antígenos de *T. solium* en LCR de pacientes con NCC utilizaron antisueros policlonales de conejo producidos contra extractos de cisticerco en bruto, con resultados prometedores pero que mostraban baja sensibilidad (Estrada *et al.*, 1989).

El uso de anticuerpos monoclonales contra una GP excretoria secretoria del metacéstodo de *T. saginata* denominada HP10 (Tabla 2), mostró una reacción cruzada inesperada



entre especies, lo cual permitió desarrollar las pruebas iniciales para la detección de antígenos de *T. solium* (Harrison *et al.*, 1989).

Posteriormente en 1992 Brandt *et al.*, hallaron ocho mAbs de isotipo IgM producidos contra productos excretores secretores de cisticercos de *T. saginata*. Dos mAbs, 12G5 y 2H8, demostraron ser altamente reactivos con antígenos obtenidos del tegumento de cisticercos viables de *T. saginata*. Aunque la sensibilidad de la prueba varió de un animal a otro, el número mínimo de cisticercos vivos, que pudo detectarse mediante el ELISA, fue de 88 quistes. Los resultados de animales con cisticercos muertos dieron reacciones similares a los animales de control no infectados. La prueba fue capaz de detectar el antígeno circulante también en ovejas y cerdos, respectivamente infectados con *T. ovis* y *T. solium* y en las muestras de suero de casos confirmados de cisticercosis humana por *T. solium*.

Estudios adicionales con mAbs IgG mejoraron el rendimiento del ELISA antígeno, los que alcanzaron una sensibilidad del 92% y una especificidad del 98.7% en sueros de bovinos infectados con cisticercosis. A su vez determinaron que el antígeno diana era termoestable y que esta condición ayudaba a disminuir la inespecificidad (Van *et al.*, 1998).

Los mAbs específicos contra *T. solium* se describieron por primera vez en 1991, los cuales detectaron eficientemente los antígenos de interés, pero no con un 100% de sensibilidad. La prueba funcionó mejor con LCR que con suero, además se observó que los niveles de antígeno disminuían después de un tratamiento exitoso (Chen *et al.*, 1991).

Tabla 2. Anticuerpos usados para el diagnóstico de NCC por captura de antígeno  
(Adaptado de Rodríguez *et al.*, 2012)

Prueba	Tipo de anticuerpo	Sensibilidad (1 lesión)	Sensibilidad (> 2 lesión)	Especificidad	Reacción cruzada	Muestra ideal
<b>HP10-ELISA</b>	mAbs contra antígenos de larvas de <i>T. saginata</i> de fluido y tegumento del quiste	N/E	75%**	100%**	<i>T. solium</i> <i>T. hydatigena</i>	Suero
<b>B158/B60-ELISA</b>	mAbs contra antígenos excretorios secretorios de larvas de <i>T. saginata</i>	N/E	N/E	N/E	<i>T. solium</i> <i>T. hydatigena</i>	LCR

Notas: LCR: Líquido cefalorraquídeo N/E: No evaluado mAbs: anticuerpos monoclonales

\*\*calculado usando solo LCR

#### 2.4.2.3. Anticuerpos monoclonales anti *T. solium* (TsmAbs)

Los anticuerpos monoclonales son producto de un clon de linfocito B con una especificidad definida y única, capaces de reconocer moléculas específicas llamadas antígenos.

En estudios recientes realizados en el Perú, se produjeron 21 anticuerpos monoclonales contra quistes de *T. solium*, que fueron evaluados en ensayos ELISA, sin generar reacción cruzada con otros parásitos relacionados a excepción de *T. saginata* en algunos casos. Ocho de los 21 TsmAbs fueron capaces de detectar antígenos circulantes en sangre humana y muestras de orina. Además, se seleccionaron 3 pares de anticuerpos

entre isotipo IgG e IgM los cuales presentaron mayor reactividad en comparación a los demás pares de anticuerpos. (Paredes *et al.*, 2016).

## **2.5. Partículas magnéticas**

Las partículas magnéticas están compuestas por un núcleo magnético de óxido de hierro (magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) o maghemita ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ )) y una envoltura polimérica que suministra los grupos funcionales necesarios para la unión de moléculas biológicas. Su tamaño final se sitúa en el rango nano y micrométrico (Anexo 13) (Ramos y Castillo, 2011).

La importancia de las partículas magnéticas deriva fundamentalmente de las propiedades físicas de su núcleo magnético, de su alta relación superficie/tamaño y de la capacidad que poseen para unir moléculas de interés biológico a su superficie. Además, su pequeño tamaño permite su interacción con estructuras celulares, ofreciendo una herramienta útil para la manipulación de diferentes funciones e interacciones con estructuras subcelulares y moleculares (Corot *et al.*, 2006).

### **2.5.1. Principio de inmovilización de los compuestos biológicamente activos**

La inmovilización de enzimas, anticuerpos, oligonucleótidos y otros compuestos biológicamente activos es una técnica utilizada en diversas áreas de la biociencia y la biotecnología. Se han desarrollado varias estrategias de conjugación covalente que utilizan grupos amina, hidroxilo, carboxilo, aldehído o tiol expuestos en la superficie de las partículas magnéticas (Safarik y Safarikova, 2009).

Las partículas magnéticas con anticuerpos inmovilizados forman la base de los procedimientos inmunomagnéticos, especialmente utilizados en microbiología y biología celular para la captura selectiva de células diana (Safarik y Safarikova, 1999).

### **2.5.2. Categorías y Principios de acoplamiento de las partículas magnéticas**

Según las diferentes aplicaciones, las propiedades de su superficie y la química de inmovilización de las partículas magnéticas, éstas se pueden agrupar en 2 grupos; las de

tipo hidrofílico, que permiten una absorción y acoplamiento suave de los ligandos, manteniendo su funcionalidad después de la inmovilización; y las de tipo hidrofóbico que son óptimas para el acoplamiento por afinidad de proteínas u orgánulos.

Para realizar el acoplamiento de las partículas magnéticas se debe considerar la naturaleza, labilidad y orientación de los grupos activos disponibles del ligando (Tabla 3).

Tabla 3. Características y propiedades de las partículas magnéticas epoxy y ácido carboxílico.

Partícula magnética	Dynabeads® M-270 epoxy	Dynabeads® M-270 ácido carboxílico
Características	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Partícula hidrofílica</li> <li>• Grupo epoxy en su superficie</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Partícula hidrofílica</li> <li>• Grupo ácido carboxílico en su superficie</li> </ul>
Tamaño	2,8um de diámetro	2,8um de diámetro
Propiedades	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Enlace de 5 -10ug Ig G/ mg de partículas</li> <li>• Enlace covalente directo entre los grupos amino primario y sulfihidrilo de proteínas y péptidos</li> <li>• No requiere activación de su superficie</li> <li>• Unión al ligando toda la noche a pH neutro, a altas concentraciones de sal y a amplios rangos de temperatura</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Enlace de 5 -10ug Ig G/ mg de partículas</li> <li>• Enlace covalente amida entre los grupos amino primario de proteínas y péptidos</li> <li>• Activación con carbodiimida</li> <li>• Unión inmediata a los péptidos a pH 5- 6 a temperatura ambiente</li> </ul>
Actividad química	100- 200 umol/ g partículas	200- 250 umol/ g partículas
Beneficios	<ul style="list-style-type: none"> <li>• La funcionalidad de las proteínas se mantiene después del aislamiento.</li> <li>• Adecuada orientación de los anticuerpos acoplados</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Enlaces 100% covalentes</li> <li>• Rápida unión química</li> <li>• Baja inespecificidad de unión con ácidos nucleicos</li> </ul>

Aplicaciones	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inmunoprecipitación de proteínas</li> <li>• Purificación de proteínas termoestables y activas.</li> <li>• Análisis de reacciones enzimáticas mediante el acoplamiento de la enzima directamente sobre las partículas</li> <li>• Inmovilización de proteínas A y G</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inmovilización de proteínas y péptidos lábiles.</li> <li>• Acoplamiento N-terminal de péptidos</li> <li>• Diagnóstico in vitro.</li> </ul>
--------------	---	---

### 2.5.2.1. Principio de acoplamiento de las partículas magnéticas con grupos epoxy

Los Dynabeads M-270 epoxy, son partículas supermagnéticas de 2.8µm que contiene grupos epoxy en su superficie. Las partículas forman enlaces covalentes con los grupos amino primario o sulfhidrilo de las proteínas (Figura 1), siendo ideales para la unión con anticuerpos. Estas partículas tienen una superficie hidrofílica que a pH neutral mantienen la baja unión inespecífica de proteínas.

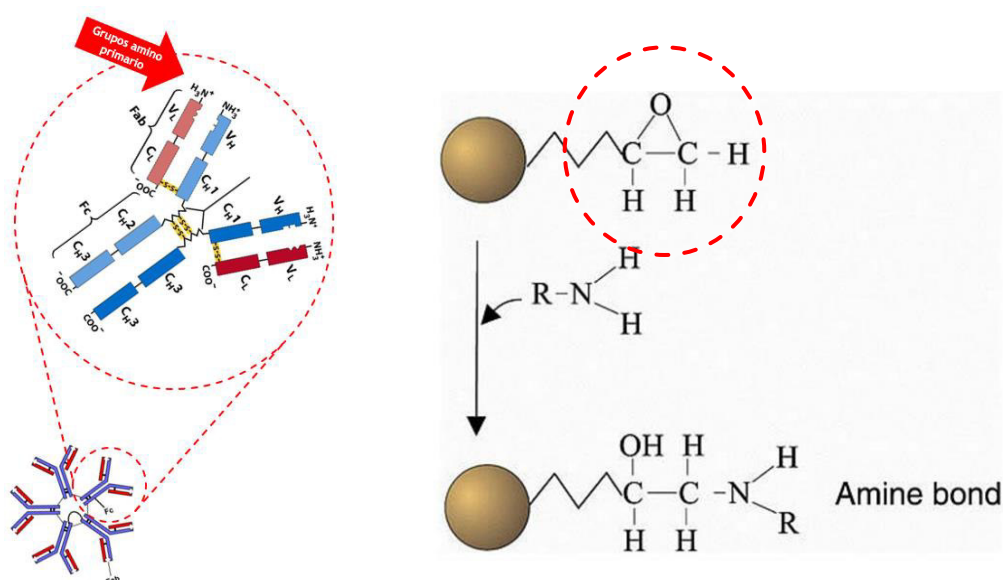


Figura 1. Formación de enlaces covalente entre los grupos amino primario de los anticuerpos y el grupo epoxy (circulo en rojo) de las partículas magnéticas.

### 2.5.2.2. Principio de acoplamiento de las partículas magnéticas con grupos ácido carboxílico

El procedimiento para el acoplamiento de ligando consiste en la formación de un enlace amida entre un grupo amino primario de los anticuerpos y los grupos de ácido carboxílico en la superficie de las partículas magnéticas mediada por la activación de carbodiimida (Figura 2). El producto intermedio de la reacción entre el ácido carboxílico y la carbodiimida es muy lábil y se hidroliza rápidamente. Para obtener la inmovilización deseada del anticuerpo es importante tenerlo inmediatamente disponible.

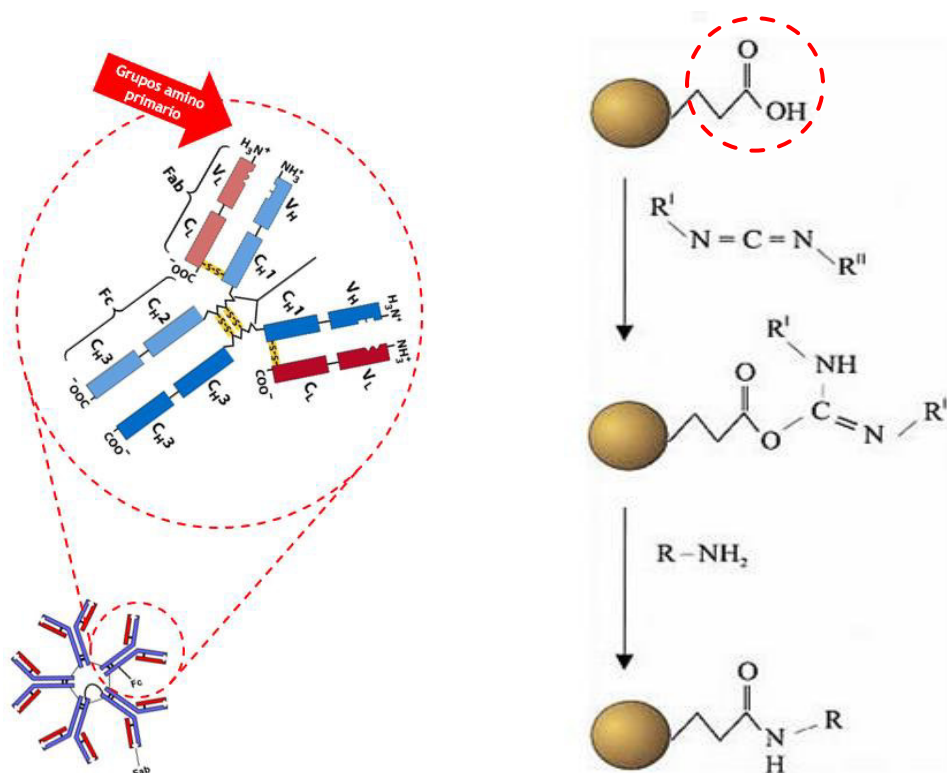


Figura 2. Formación de enlaces amida covalente entre los grupos amino primario de los anticuerpos y el grupo ácido carboxílico (circulo en rojo) de las partículas magnéticas.

### **2.5.3. Aplicaciones de las partículas magnéticas como posibles herramientas de diagnóstico**

Se han realizado diversos estudios en los cuales se utilizaron partículas magnéticas para la detección de diversas infecciones bacterianas y parasitarias.

Castro *et al.*, 2016, realizaron un ensayo basado en el uso de nanopartículas con grupos epoxy para detectar y cuantificar la histidine-rich protein 2 (HRP2) de *Plasmodium falciparum* en orina y suero, lo cual permitió concentrar 20 veces dicha proteína en volúmenes grandes de orina (Castro *et al.*, 2016).

Otros investigadores mostraron que el ELISA puede ser utilizado para confirmar la adsorción de ligandos a las partículas magnéticas. Requiriendo pequeñas cantidades de partículas y ligando. El uso de anticuerpos monoclonales en el ELISA con partículas magnéticas verifica no sólo el recubrimiento exitoso del ligando, sino también la accesibilidad superficial del epítipo correspondiente (Kourilov *et al.*, 2002).

En otra investigación se logró la separación péptido magnética (PMS) utilizando partículas magnéticas tosyl recubiertos "in house" con un anticuerpo policlonal (S624) y/o con péptidos de *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* para su detección y enumeración viable en muestras de leche (Foddai *et al.*, 2010).

Las partículas magnéticas Dynabeads M-270 ácido carboxílico fueron utilizadas para inmovilizar los scFv CIMS (cadena ligera del anticuerpo de contexto motivo específico independiente) utilizados frente a grupos de fragmentos de péptidos antigénicos (Sall *et al.*, 2016).

Berth *et al.*, en el 2008 realizaron inmunoensayos con ocho partículas magnéticas: M-270 amina, M-270 ácido carboxílico, M-270 epoxy, M- 280 IgG anti - ratón de oveja, M-270 estreptavidina, M-280 estreptavidina y M-280 tosyl, detectando interferencia en el inmunoensayo por parte de algunas partículas en estudio, lo que provocó resultados

reactivos inesperados. Una evaluación sistemática de la IgM contra el virus Epstein-Barr demostró que el 5% de los resultados positivos (0,4% de las muestras analizadas) podrían explicarse por dicha interferencia. La adición de reactivos químicos de bloqueo (polivinilpirrolidona y alcohol polivinílico) a los tampones de ensayo previno parcialmente este fenómeno.



### **III. HIPÓTESIS**

Las partículas magnéticas como soporte de anticuerpos monoclonales permiten detectar antígenos circulantes en muestras de orina de pacientes con Neurocisticercosis.

#### IV. OBJETIVOS

##### **General:**

- Evaluar las partículas magnéticas epoxy y ácido carboxílico como soporte de unión a anticuerpos monoclonales para pruebas de detección de antígenos en neurocisticercosis humana.

##### **Específicos:**

- Conjugar las partículas magnéticas de grupo epoxy y ácido carboxílico con anticuerpos monoclonales anti *Taenia solium*.
- Determinar la capacidad de reconocimiento antigénico del anticuerpo conjugado a las partículas magnéticas.
- Seleccionar la partícula magnética conjugada con mayor capacidad de detección de antígenos para el diagnóstico de neurocisticercosis Humana.
- Evaluar los parámetros optimizados del ELISA basado en partículas magnéticas en muestras de orina de pacientes con neurocisticercosis humana.

## **V. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **5.1. Material biológico**

Anticuerpos monoclonales isotipo IgM de las clonas TsW8 y TsW5- biotina, producidos contra antígeno total de quistes de *T. solium*, facilitados por el Cysticercosis working group in Perú. Además, se utilizó un anti-IgM comercial producido en ratón y marcado con biotina.

Pool positivo y negativo de orina humana obtenidos a partir de la combinación de muestras humanas de orina de pacientes positivos y negativos a NCC, respectivamente.

### **5.2. Lugar de estudio**

El presente estudio se ejecutó en el Laboratorio de Inmunología Parasitaria del Laboratorio de Investigación y Desarrollo (LID) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, ubicada en el distrito de San Martín de Porres, provincia de Lima, departamento de Lima.

### **5.3. Población de estudio:**

Se utilizaron en total 64 muestras de orina humana: 16 muestras de orina procedentes de pacientes diagnosticados con NCC subaracnoidea, 27 muestras de orina de pacientes diagnosticados con NCC calcificada y 21 muestras de orina de voluntarios sanos obtenidas de pacientes no neurológicos, sin ninguna imagen cerebral y confirmados por ELISA Ag y técnica de Western blot.

Las muestras de orina de pacientes diagnosticados con NCC fueron confirmadas por neuroimagen de TAC y/o RM del cerebro y técnica de Western Blot, su colección fue realizada por la Unidad de Cisticercosis del Instituto de Ciencias Neurológicas Lima-Perú (INCEN), se consideró pacientes con sospecha de NCC entre abril y junio del 2018, dentro de estudios de investigación que contaban con las aprobaciones éticas correspondientes y previa firma de consentimiento informado (Anexo 1).

#### **5.4. Colección y procesamiento de las muestras de orina**

Las muestras de orina humana se colectaron en recipientes de plástico, codificadas y mantenidas en refrigeración hasta su transvase a tubos cónicos de 50 mL, dentro de las 8 horas (posteriores a su colecta). Los tubos se centrifugaron a 3200 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se traspasó el sobrenadante de orina centrifugada a otros tubos de 50ml y a viales de 1.5ml debidamente rotulados y se almacenaron a -20°C hasta su uso.

#### **5.5. Métodos**

##### **5.5.1. Conjugación de anticuerpos monoclonales a Dynabeads M-270 epoxy (2,8 um)**

Para su conjugación se utilizó 2.5mg de partículas epoxy los cuales fueron lavados 2 veces con 500ul de buffer fosfato salino (PBS) con tween 0.05% y una vez con PBS con la ayuda de un soporte magnético. Luego se resuspendió en 100 ul de buffer fosfato de sodio 0.1M y se agregó 100ul de mAbs TsW8 (500ug/ml) se homogenizó hasta disolver las partículas magnéticas e inmediatamente se agregó 100 ul de sulfato de amonio 3M. Se incubó por 24 horas a 37°C en rotación lenta. Al día siguiente se lavó el conjugado 4 veces con 500ul de PBS con la ayuda de un soporte magnético, se resuspendió en 250ul de PBS y se almacenó a 5°C hasta su uso.

##### **5.5.2. Conjugación de anticuerpos monoclonales a los Dynabeads M-270 ácido carboxílico (2,8 um)**

Para su acoplamiento se resuspendió 100ul de las partículas magnéticas en un vial, se lavó dos veces con 100 ul de NaOH 0,01 M con la ayuda de un soporte magnético y se incubó por 10 minutos cada vez en constante rotación, luego se lavó tres veces más con 100ul de agua desionizada. Posteriormente se añadió 150 µl de solución 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC) 0.2M e incubó a temperatura ambiente por 30 minutos. Las partículas se lavaron con 100ul de agua desionizada y

100ul de buffer 2-[N-morpholino] ethane sulfonic acid (MES) 50 mM pH 5 con la ayuda de un soporte magnético. Luego se agregó 100ul de mAbs TsW8 (600ug/ml) y se incubó por 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente se lavó 2 veces con PBS tween 0.1% y se almacenó en el mismo buffer con 0.02% de azida de sodio hasta su uso.

### **5.5.3. Control de calidad de la conjugación entre la partícula magnética y los anticuerpos monoclonales**

Una vez realizada la unión de las partículas magnéticas epoxy y ácido carboxílico con el mAb TsW8 y previo a su evaluación con muestras de orina, se realizó un ELISA indirecto de detección del mAb isotipo IgM TsW8 debidamente acoplados a las partículas magnéticas. Se añadió en diferentes viales 10ul (0.1mg) de las partículas magnéticas epoxy y ácido carboxílico conjugadas al mAb TsW8, así como partículas sin conjugar, posteriormente se bloqueó con 500ul de leche descremada al 5% y se incubó a temperatura ambiente por 45 minutos en rotación. Luego se lavó 3 veces con 500ul de PBS tween 0.05%, se agregó 100ul de anti IgM biotinilado dilución 1/4000 y se incubó por 30 minutos en rotación, luego de los lavados se adicionó 250ul de Estreptavidina-HRP dilución 1/10000, se incubó por 15 minutos, se volvió a lavar 3 veces con PBS tween 0.05% y se reveló con 100ul de 3,3',5,5' tetrametil-bencidina (TMB). La absorbancia se registró a 650 nm haciendo uso de un espectrofotómetro Microplate reader Vmax, Molecular device (Figura 3).

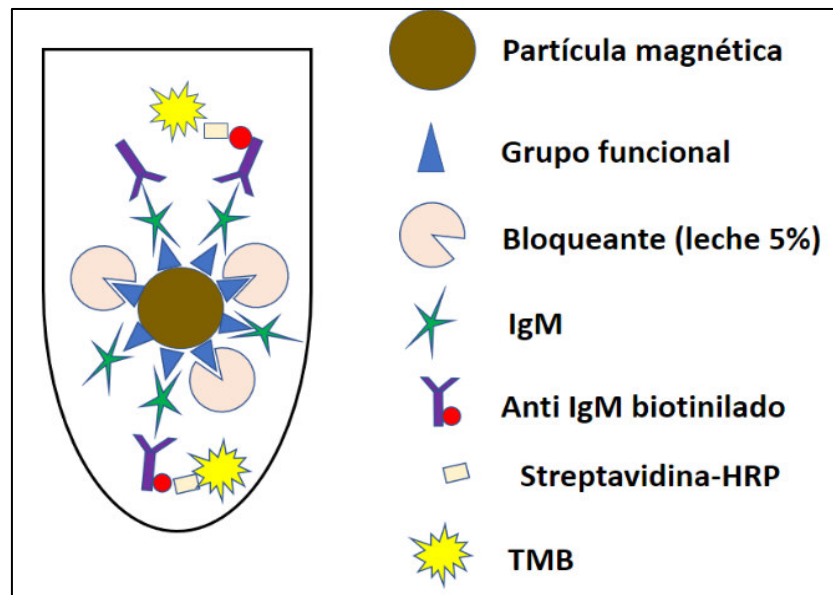


Figura 3. Esquema de Elisa control de calidad de la conjugación partícula magnética-mAb TsW8. En presencia del anticuerpo, se forma un complejo molecular entre la IgM y en conjugado anti IgM biotinilado, donde el sustrato fotoactivo (TMB) reacciona emitiendo una señal de coloración.

#### 5.5.4. Control de calidad de la capacidad de reconocimiento del antígeno por parte del anticuerpo monoclonal acoplado a las partículas magnéticas

Se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) de los eluidos del inmunocomplejo partícula magnética-mAbs- antígeno con la finalidad de determinar si mediante el proceso de conjugación de los anticuerpos a las partículas magnéticas epoxy y ácido carboxílico, hubo algún daño de las regiones de reconocimiento antigénico del anticuerpo.

Se siguieron los siguientes pasos:

##### a) Incubación del pool de orina humana con las partículas magnéticas

Se prepararon 2 pool de orina, un pool positivo a partir de muestras de pacientes con NCC subaracnoidea y pool negativo a partir de muestras de orina de voluntarios sanos.

Posteriormente se alicuotó 5ul (0.1mg) de los dos tipos de partículas magnéticas conjugadas a los mAbs en diferentes viales con fondo cóncavo, se lavaron 3 veces con PBS Tween 0.05% y se bloquearon con leche descremada al 2% por 1 hora a temperatura ambiente. Luego se volvió a lavar por 3 veces y se añadió 1mL del pool de orina y se incubó toda la noche a 5°C en rotación.

#### **b) Elución del inmunocomplejo**

Luego de la incubación se descartó el contenido con la ayuda de un soporte magnético y se lavaron las partículas magnéticas 3 veces con PBS tween 0.05%, posteriormente se agregó 25ul de glicina 0.1M pH 2 y se incubó 20 min a temperatura ambiente en movimiento, se vortexearon los viales por 1 minuto a la máxima velocidad y se incubaron a 96°C por 10 minutos en baño maría. Se colocaron los tubos en el soporte magnético y se recuperó el eluido en viales de 0.5ml y se agregó 3.75ul de buffer de neutralización, se homogenizó y se guardó a -20°C.

#### **c) Electroforesis SDS- PAGE**

Se utilizó un gel de gradiente de 15% - 25%. Con la ayuda de dos placas de vidrio (uno más corto que el otro) y dos separadores se armó un “sándwich”, éste se introdujo en un soporte formador de geles y se sujetó el conjunto.

Se preparó el gel “resolving” o gel de resolución o de separación al 15% y 25% de acrilamida, se mezcló en un vaso de precipitado con el tris 1M pH 8.8 y el SDS 10% y finalmente se añadió la tetrametiletilendiamina (TEMED) y el persulfato amónico (APS) para iniciar la reacción de polimerización, con la ayuda de una pipeta se cargó la mezcla aun líquida, en el espacio entre las dos placas de vidrio, hasta unos 2- 5cm del borde superior del cristal corto y se agregó isobutanol o agua para acelerar el gelificado, se esperó aproximadamente 20-25 minutos hasta que gelifique. Se retiró el agua o isobutanol y se secó con papel filtro.

Se preparó el gel “stacking” o gel de empacamiento o de concentración al 4%, se colocó el peine o separador suavemente y esperó 20 minutos hasta que gelifique.

Posteriormente se armó el gel en la cámara electroforética, se agregó el buffer Upper al cassette conteniendo el gel y se llenó la cámara electroforética con buffer Lower hasta la marca indicada. Se colocó el cassette con el gel dentro de la cámara y se retiró el peine o separador, se cargó 15ul de muestra en cada pocillo, además de 5 ul del marcador de peso molecular. (Para 25uL de muestra de eluido antigénico se agregó 2.5uL de buffer de carga: azul de bromofenol + glicerol +SDS).

Se tapó la cámara tomando en cuenta la dirección de ánodo y cátodo y se conectó a la fuente de poder, se corrió a 35mA por 10-15 minutos aproximadamente. Cuando se observaron todas las muestras alineadas, se cambió a 50mA por 35-45 minutos aproximadamente para 4 geles.

Finalmente se desconectó todo el equipo, se retiró el gel de los vidrios y se realizó la coloración del gel con nitrato de plata con el kit Silver Stain BioRad.

Para este fin se sumergió el gel en la solución fijadora toda la noche, al día siguiente se incubó el gel por 5 minutos en la solución oxidante y se lavó por 15 minutos con el buffer de lavado. Transcurrido el tiempo de lavado, se sumergió el gel en el reactivo de plata por 20 minutos, después se enjuagó rápidamente con agua por 30 segundos, se sumergió en la solución reveladora por 5 minutos hasta observar las bandas y se detuvo la reacción sumergiendo el gel en la solución de parada (ácido acético 5%) por 15 minutos. (Anexo 14).

#### **5.5.5. Optimización del inmunoensayo con partículas magnéticas en muestras de pool de orina humana**

Se evaluaron cinco parámetros que contribuyeron a la optimización del inmunoensayo: pH de la orina, cantidad de partículas magnéticas, agentes bloqueantes, concentración de anticuerpos de detección y volumen de muestra.



Para la evaluación de la influencia del pH se consideraron 3 valores de pH de orina: 5, 6 y 7. Los pool positivo y negativo originalmente con pH 7 fueron modificados artificialmente con HCl para obtener los otros valores de pH. Se realizó un ELISA tipo sándwich con 0.1mg de partículas conjugadas a los mAbs TsW8 en viales de 2ml de fondo cóncavo. Las partículas epoxy fueron bloqueadas con Newborn Calf Serum (NBCS) al 1% y las partículas ácido carboxílico con leche descremada al 2% durante 1 hora y media a temperatura ambiente. Posteriormente se lavó 3 veces con PBS tween 0.05% y se adicionó 200ul de pool de orina positiva y negativa de pH 5, 6 y 7 y se incubó toda la noche a 4°C. Posteriormente se lavó y se adicionó el conjugado biotinilado (4ug/ml) y se incubó por 1 hora a 37°C, se lavó 3 veces con PBS tween 0.05%, se adicionó la estreptavidina-HRP 1/10000, se incubó 15 minutos a 37°C, se lavó y finalmente se adicionó el TMB. Se traspasó el volumen de cada vial a una placa y se incubó por 5 minutos cubierto de la luz, se añadió la solución de parada  $H_2SO_4$  2N y se traspasó el contenido sin partículas a otros pozos. La absorbancia se registró a 450 nm haciendo uso de un espectrofotómetro Microplate reader Vmax, Molecular device.

Para la determinación de la cantidad adecuada de partículas magnéticas se tomó como base el protocolo mencionado en el párrafo anterior. Se evaluaron 5 concentraciones de los dos tipos de partículas magnéticas: 0.1mg, 0.05mg, 0.025mg, 0.0125mg y 0.0063mg.

Una vez determinada la cantidad de partículas epoxy y ácido carboxílico adecuadas y siguiendo el protocolo base, se evaluaron 7 agentes bloqueantes: Leche descremada 2%, albumina de suero bovino (BSA) 2%, suero fetal bovino (SFB) 1%, NBCS 1%, ovoalbúmina 1%, leche descremada 1% + SFB 0.5% y Leche 1% + NBCS 0.5%, con 0.0063mg de cada partícula y se enfrentó con 200ul de pool positivo y negativo de orina.

Para la evaluación de la concentración del mAb de detección TsW5- biotina, se evaluaron 8 concentraciones: 0.125 ug/ml, 0.25 ug/ml, 0.5 ug/ml, 1 ug/ml, 2 ug/ml, 4 ug/ml, 6 ug/ml y 8 ug/ml con 0.0063mg de cada partícula y se enfrentó a 200ul de pool de orina positiva y negativa.

Finalmente, para la optimización del volumen de muestra de orina, se evaluaron 5 volúmenes de pool de orina positiva y negativa: 0.2 mL, 0.5 mL, 1 mL, 2 mL y 5 ml para 0.0063mg de cada partícula magnética.

Se obtuvo como producto final 2 protocolos de Elisa basados en partículas magnéticas (Anexo 16 y 17), de los cuales sólo se seleccionó el protocolo basado en la partícula magnética ácido carboxílico para la evaluación de las muestras de orina (Figura 4).

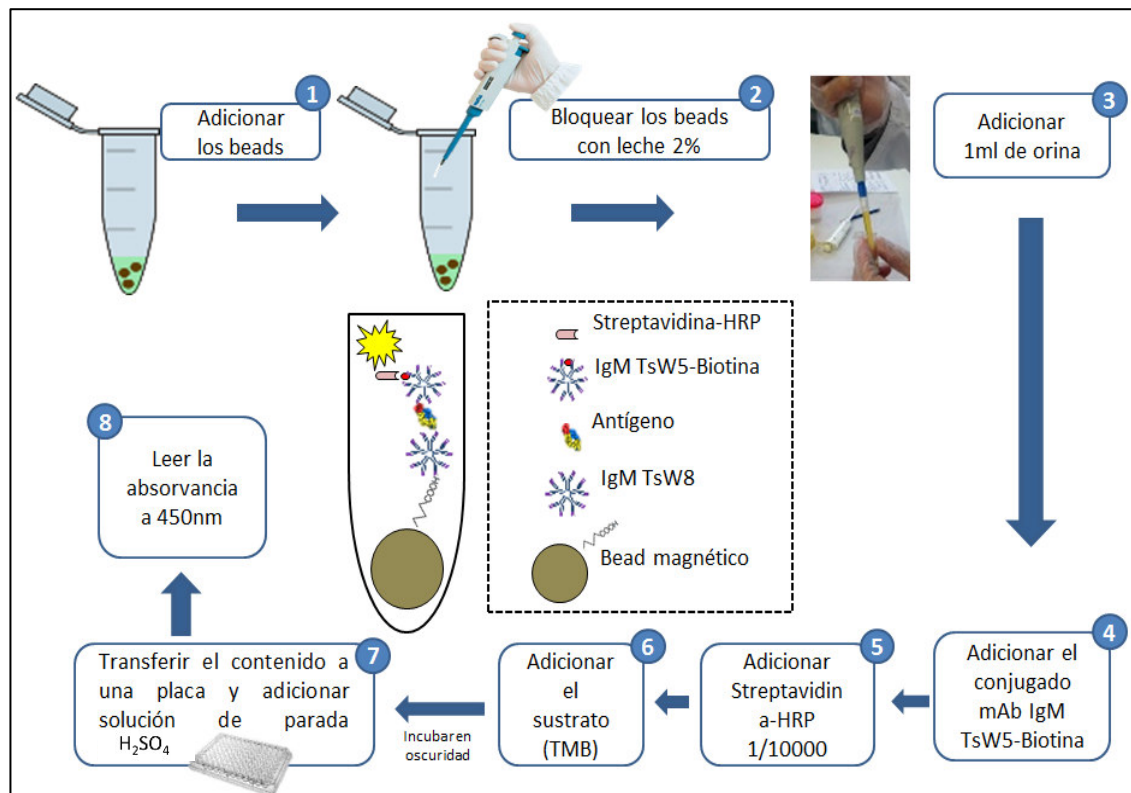


Figura 4. Flujograma de Ensayo ELISA basado en el uso de partículas magnéticas con orina

#### 5.5.6. Evaluación de los parámetros optimizados del inmunoensayo basado en partículas magnéticas con muestras de orina humana de pacientes con NCC

Considerándose los ensayos anteriores, la cantidad de anticuerpo purificado, los volúmenes de pool y muestra de orina humana disponibles se realizó la evaluación de 64 muestras de orina, de las cuales 43 muestras pertenecían a pacientes diagnosticados con NCC (16 subaracnoideos y 27 calcificados) y 21 muestras de voluntarios sanos.

Se adicionó 0.063mg de la partícula magnética ácido carboxílico conjugada al mAb TsW8 a un vial, se lavó 2 veces con PBS Tween 0.05% con la ayuda del soporte magnético. Luego se bloqueó con 500 ul de PBS Tween leche 2% y se incubó 1 hora y 30 minutos a temperatura ambiente en constante rotación. Se descartó el contenido del tubo y se lavó 2 veces con PBS Tween 0.05% y se añadió 1ml de orina para ser incubada toda la noche a 4°C en rotación lenta. Al día siguiente se atemperó por 10 minutos y se lavó 4 veces con PBS Tween 0.05%, posteriormente se agregó 100 ul de anticuerpo monoclonal biotinilado (TsW5-biotina) a 1ug/ml y se incubó 1 hora y 30 minutos a 37°C en agitación, luego se lavó 4 veces con PBS Tween 0.05% y se añadió 250 ul de Estreptavidina-HRP 1/10000 e incubó 15 minutos a 37°C en agitación. Finalmente se lavó 4 veces con PBS Tween 0.05%, se añadió 100 ul de TMB por vial, se traspasó inmediatamente el contenido a la placa, se incubó en oscuridad y agitación por 5 minutos, se detuvo la reacción con 50ul solución de parada ( $\text{H}_2\text{SO}_4$  2N) y se separó 150 ul de cada pozo con la ayuda del soporte magnético del contenido sin partículas a otros pozos. La absorbancia se registró a 450 nm con un espectrofotómetro Microplate reader Vmax, Molecular device.

Para el análisis de los resultados obtenidos se utilizó el programa *graphpad prism versión 5*.

## VI. RESULTADOS

### 6.1. Control de calidad de la conjugación entre la partícula magnética y los anticuerpos monoclonales

Luego de la conjugación de las partículas magnéticas y los mAbs, se realizó un ELISA de control, el cual evidenció un adecuado acoplamiento reflejado en los valores de absorbancia (Tabla 4). Ambas partículas conjugadas a los anticuerpos saturaron la reacción inmunoenzimática.

Tabla 4: Resultados de la conjugación de las partículas magnéticas y el mAb TsW8, expresados en densidades ópticas (OD).

Partícula magnética - mAbs TsW8	Cantidad de partículas (mg)	OD (Partículas magnéticas + mAbs)	OD (Partículas magnéticas solas)
<b>Epoxy</b>	0.1	4	0.384
<b>Ácido carboxílico</b>	0.1	4	0.46

### 6.2. Control de calidad de la capacidad de reconocimiento del antígeno por parte del anticuerpo monoclonal acoplado a las partículas magnéticas

Se realizó la corrida electroforética de los eluidos obtenidos post incubación con pool de orina positiva, observándose la presencia de dos bandas antigénicas de entre 25 y 37 kDa (Figura 5) para ambas partículas magnéticas, evidenciándose que los anticuerpos acoplados no perdieron su capacidad de reconocimiento antigénico.

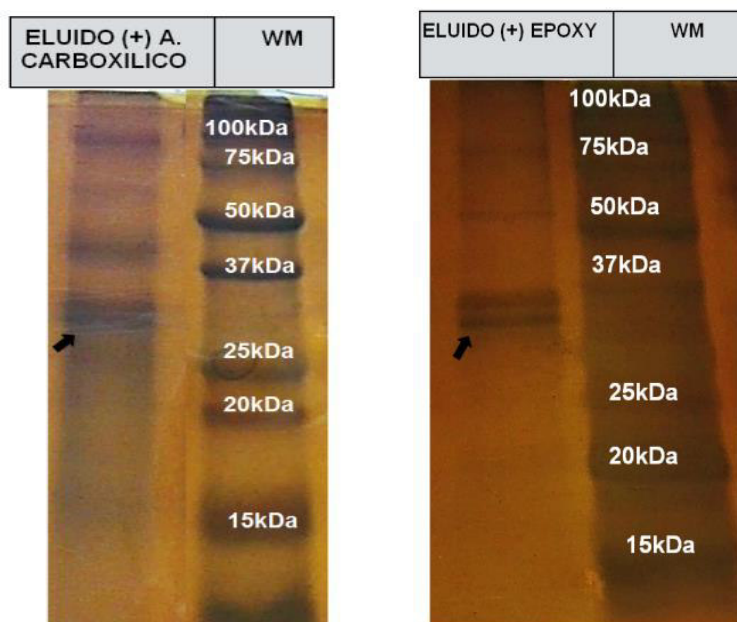


Figura 5: Electroforesis en SDS- PAGE del eluido de inmunocomplejo antígeno-anticuerpo. Las flechas negras indican las bandas correspondientes al antígeno capturado por el mAb TsW8 conjugado a las partículas magnéticas.

### 6.3. Optimización del inmunoensayo con partículas magnéticas en muestras de pool de orina humana

Se evaluaron cinco parámetros para la optimización del inmunoensayo: pH de la orina, cantidad de partículas magnéticas, agentes bloqueantes, concentración de anticuerpos de detección y volumen de muestra, tomándose en cuenta un criterio de comparación entre los grupos en función a la discrepancia de ratios obtenidos.

El pH del pool de orina positivo y negativo no influyó en la capacidad de captura del antígeno circulante en las orinas por parte de las partículas magnéticas acopladas a los mAbs. Esto se demuestra en los valores de ratio obtenidos, los cuales oscilan entre 2.48 a 2.93 para ambos tipos de partículas, en donde el rango de ratios es muy estrecho por lo que la variación de pH de las muestras ya sea de una orina de pH bajo o neutro, no presenta significancia en el inmunoensayo (Figura 6).

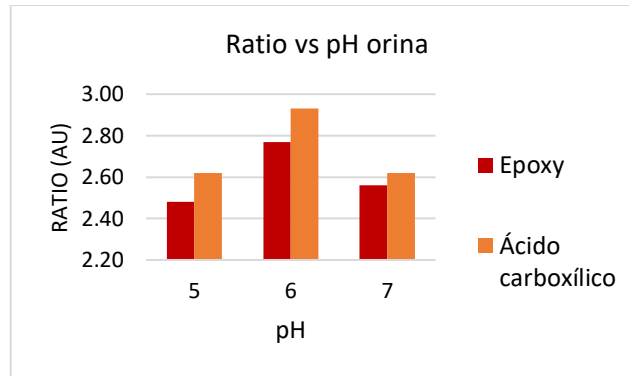


Figura 6. Evaluación de la influencia del pH de la orina en los inmunoensayos. Los resultados están expresados en ratios (OD orina positiva entre OD de la orina negativa). Los ratios oscilan entre valores de 2.48 a 2.93 para ambos tipos de partículas.

Otro parámetro evaluado fue la cantidad de partículas magnéticas que se usarían en el inmunoensayo, observándose que, a menor cantidad de partículas magnéticas utilizadas, se obtenían mayores ratios, ya que los valores de absorbancia del pool negativo disminuían, evidenciándose así la disminución significativa de la inespecificidad en el inmunoensayo, siendo 0.0063mg la cantidad adecuada para las partículas epoxy y ácido carboxílico (Figura 7).

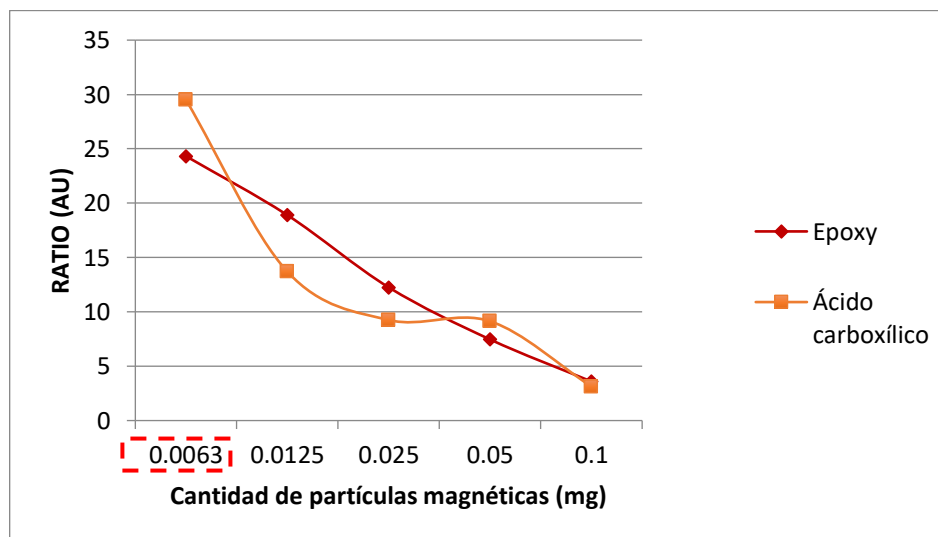


Figura 7. Evaluación de la cantidad de partículas magnéticas. Los resultados están expresados en ratios (OD orina positiva entre OD de la orina negativa). Se obtienen mejores resultados al disminuir la cantidad de partículas magnéticas.

Con la finalidad de seguir disminuyendo las reacciones inespecíficas del inmunoensayo, se evaluaron ocho agentes bloqueantes. La leche descremada en polvo al 2% presentó el mejor *performance*, obteniendo un ratio de 43.16 para partículas epoxy y una ratio de 54.58 para las partículas ácido carboxílico (Figura 8).

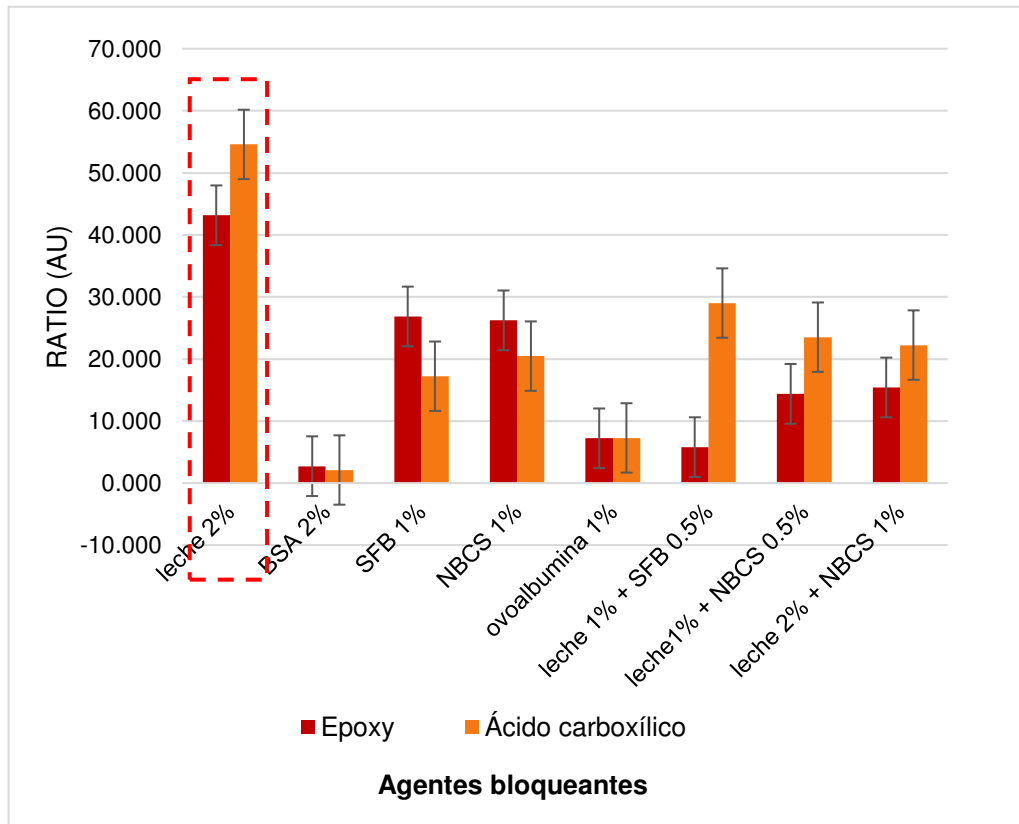


Figura 8. Evaluación de agentes bloqueantes para las partículas magnéticas epoxy y ácido carboxílico. Las líneas punteadas en rojo corresponden al mejor agente bloqueante (leche descremada al 2%) determinado en el ELISA.

En la evaluación de la concentración del anticuerpo monoclonal de detección para el inmunoensayo, la partícula epoxy obtuvo mejor ratio con 0.25ug/ml de anticuerpo de detección, mientras que la partícula ácido carboxílico obtuvo mejor contraste con 1ug/ml de anticuerpo (Figura 9).

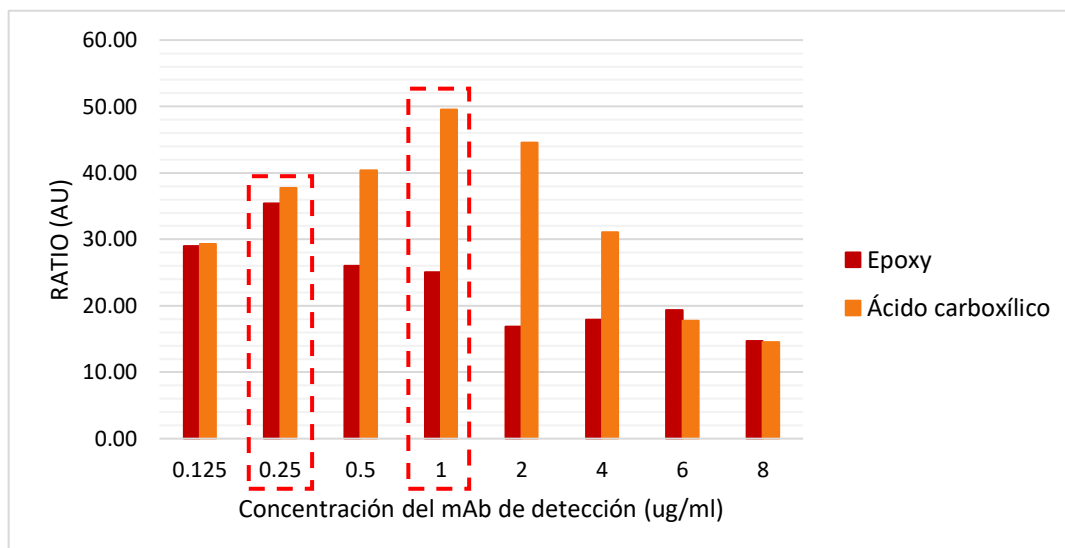


Figura 9. Evaluación de la concentración de mAbs de detección TsW5- biotina para las partículas magnéticas epoxy y ácido carboxílico. Las líneas punteadas en rojo corresponden a la mejor concentración de mAb de detección (0.25 ug/ml para las partículas epoxy y 1 ug/ml para las partículas ácido carboxílico).

Para la determinación del volumen óptimo de muestra se evaluaron cinco parámetros, siendo el mejor performance 1 ml de muestra para ambas partículas, ya que se obtuvieron mejores ratios en la evaluación con *pool* de orina (Figura 10).

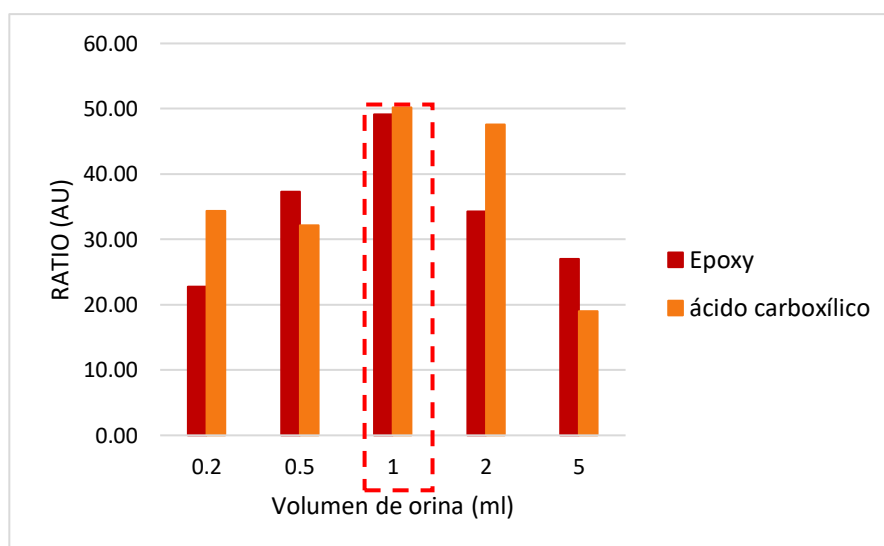


Figura 10. Evaluación del volumen de orina para las partículas magnéticas epoxy y ácido carboxílico. Las líneas punteadas en rojo corresponden al mejor volumen de orina.



En cuanto a la elección de la partícula magnética a utilizarse en la evaluación con muestras de pacientes, se eligió a la partícula ácido carboxílico, debido a que su proceso de conjugación con el anticuerpo monoclonal, su *performance* de estabilidad en los diferentes parámetros evaluados, fueron más sencillos y estables, e inclusive ligeramente mejores en comparación a las partículas Epoxy.

#### 6.4. Evaluación de los parámetros optimizados del basado en partículas magnéticas en muestras de orina humana de pacientes con NCC

Los resultados se clasificaron en dos grupos de evaluación según el tipo de NCC de los pacientes: Grupo NCC subaracnoidea y Grupo NCC calcificada.

El óptimo punto de corte para el ELISA basado en partículas magnéticas optimizado se determinó mediante curva receiver operating characteristic (ROC) obtenida con el programa *graphpad prism* versión 5.

Para el grupo NCC subaracnoidea se obtuvo a partir de la curva ROC un óptimo punto de corte de 0.164, una sensibilidad de 100% y una especificidad de 100% (Figura 11).

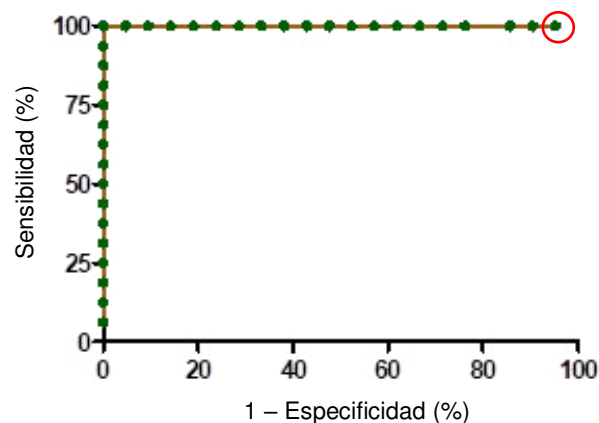


Figura 11: Curva ROC. ELISA con partículas magnéticas grupo NCC subaracnoidea. Óptimo punto de corte: círculo rojo.

Para el grupo NCC calcificada se obtuvo a partir de la curva ROC un óptimo punto de corte de 0.076, una sensibilidad de 70.37% y una especificidad de 42.86% (Figura 12).

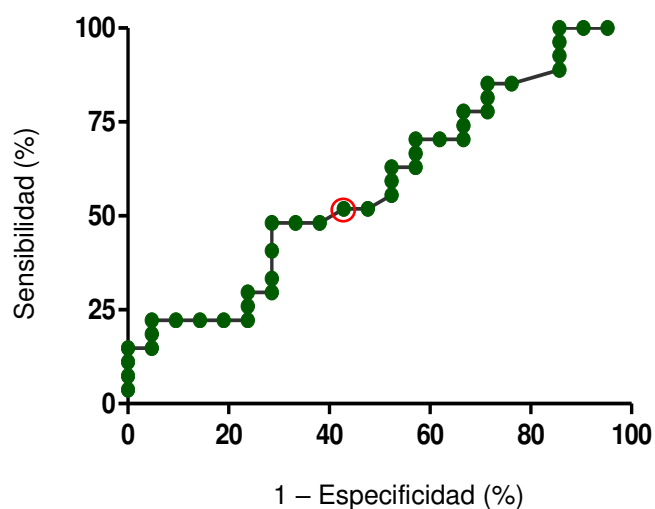


Figura 12: Curva ROC. ELISA con partículas magnéticas grupo NCC calcificada. Óptimo punto de corte: círculo rojo.

Los 16 pacientes subaracnoideos fueron positivos, 4 de los 27 calcificados fueron positivos y los 21 voluntarios sanos resultaron negativos al inmunoensayo basado en el uso de partículas magnéticas (Tabla 5).

Tabla 5. Resultados del ELISA basada en el uso de partículas magnéticas expresados en densidades ópticas (OD) promedios y proporción (%) de resultados positivos en cada grupo de evaluación.

Promedio de OD y proporción (%) de resultados positivos, N=64						
Ensayo/ Pacientes	Pacientes con NCC subaracnoidea (n=16)		Pacientes con NCC calcificada (n=27)		Voluntarios sanos (n=21)	
<i>Bead- based</i> ELISA	OD promedio	Positivos (%)	OD promedio	Positivos (%)	OD promedio	Positivos (%)
<b>orina</b>	<b>1.67</b>	<b>16 (100)</b>	<b>0.27</b>	<b>4 (14.8)</b>	<b>0.087</b>	<b>0 (0)</b>

## VII. DISCUSIÓN

En general, la detección de anticuerpos mediante las técnicas inmunológicas no tiene la capacidad de distinguir entre la exposición, infección inactiva o la infección activa de NCC, además tienen un bajo valor predictivo positivo en los casos de cisticercosis viables debido a las reacciones de anticuerpos positivos en personas con cisticercos calcificados y un alto fondo de seroprevalencia en la población general en áreas endémicas (Singh *et al.* 1999).

Durante el proceso de conjugación de los anticuerpos monoclonales isotipo IgM a las partículas magnéticas se necesitó de un ensayo que permitiese evidenciar una conjugación exitosa, y además de otro ensayo que demuestre que los sitios de reconocimiento antigénico del anticuerpo no hayan sido dañados en alguno de los procesos de conjugación. Un ELISA indirecto basado en el uso de un anti-anticuerpo marcado con biotina permitió demostrar la presencia de los mAbs acoplados a las partículas magnéticas. La electroforesis SDS- PAGE con tinción de nitrato de plata de los eluidos del inmunocomplejo antígeno anticuerpo demostró la presencia de proteínas antigénicas de orina de bajo peso molecular entre 25 y 37 kDa, este tamaño de proteínas fácilmente puede atravesar la barrera de filtración del riñón, las cuales deben ser menores a 70 kDa (Bueno *et al.*, 2005).

En el proceso de optimización del inmunoensayo se evaluaron cinco parámetros: pH de la orina, cantidad de partículas magnéticas, agentes bloqueantes, concentración de anticuerpos de detección y volumen de muestra, con la finalidad de obtener un mejor rendimiento en la discriminación entre las muestras de orina humana positivas y negativas. Con respecto al pH se demostró que no es necesario modificar el pH de las muestras de orina humana hasta llevarlo a un pH neutro, resultado que diverge con lo descrito por Mateo *et al.* (2000) quienes indican que para la adecuada reacción de los grupos funcionales epoxy y ácido carboxílico se requiere un pH neutro.

Con relación al parámetro cantidad de partículas magnéticas, se evidenció que a menor cantidad de partículas se obtenían mejores ratios ya que los valores de absorbancia del pool negativo de orina humana disminuían, mientras que la absorbancia del pool positivo de orina humana se mantenía estable. El uso óptimo de pequeñas cantidades de partículas magnéticas fue demostrado por Hernández *et al.*, (2017) quienes en una plataforma multiplex basado en partículas magnéticas probaron diferentes cantidades de antígenos recombinantes de *T. solium* acoplados a las partículas como potenciales herramientas de detección de anticuerpos.

Durante el proceso de incubación de las partículas magnéticas con las muestras de orina humana, se observó que al utilizarse 0.0063mg de partículas magnéticas conjugadas a los mAbs, no había aglomeración como cuando se utilizaban 0.1mg de partículas. La aglomeración de las partículas magnéticas durante el proceso incubación con las muestras de orina humana influenció en el enmascaramiento del antígeno circulante de interés, así como en el aumento de la inespecificidad del inmunoensayo.

En la evaluación de los agentes bloqueantes del ELISA basado en partículas magnéticas, la leche descremada al 2% fue la que obtuvo mejores resultados al bloquear las regiones que no fueron ocupadas por los mAbs inmovilizados sobre la superficie de la partícula, resultado que concuerda con lo descrito por Hernández *et al.*, (2017), quienes utilizaron leche descremada al 5% como buffer de bloqueo y buffer de dilución de muestra en un ELISA basado en partículas magnéticas.

Las muestras de orina humana son consideradas no invasivas y de fácil acceso, esto permitió que el desarrollo de esta plataforma basada en partículas magnéticas se realice en recipientes con capacidad de volúmenes grandes de muestra, como 1, 2 y 5 ml, lo cual no se podría realizar en una placa de ELISA convencional cuyo volumen máximo de capacidad por pozo es de 300ul. Además, cabe mencionar que la superficie esférica de las partículas magnéticas permite la interacción de los antígenos y anticuerpos en toda la superficie, y no en un solo plano como ocurre con las placas de ELISA convencional

utilizadas por Kungu *et al.*, (2017), quienes evaluaron la detección de antígenos de cisticercos en muestras de suero porcino.

Mediante el análisis de índices de reactividad con curvas ROC, se determinó el punto de corte óptimo con el cual se obtuvo 100% de sensibilidad y 100% de especificidad en la evaluación de muestras de orina humana de pacientes con NCC subaracnoidea, esto permitiría una buena captación de muestras positivas de pacientes con este tipo de lesión. La detección de antígeno de pacientes con NCC subaracnoidea también fue estudiada por Rodríguez *et al.*, (2009), quienes concluyeron que altos niveles de antígeno sugieren una NCC subaracnoidea.

Con respecto a la obtención de 4 positivos en muestras de pacientes con NNC calcificada, en la cual el parásito se encuentra en estado degenerativo y los niveles de antígeno circulante son muy escasos, podría estar relacionado con los casos de tomografías en donde se puede observar la aparición de un edema perilesional alrededor del nódulo calcificado debido quizás a los restos del parásito involucionado. Se especula que estas lesiones tienen un factor de riesgo adicional para crisis epilépticas después del tratamiento (Estrada *et al.*, 2013).

Considerando los bajos niveles de antígeno en muestras de pacientes con NCC calcificada, y el hecho de haber detectados 4 positivos de los 27 pacientes con este tipo de lesión, se podría decir que las partículas magnéticas permiten la concentración de los antígenos circulantes (Yu *et al.*, 2012; Castro *et al.*, 2016).

## VIII. CONCLUSIONES

- Las partículas magnéticas epoxy y ácido carboxílico son un buen soporte de unión de anticuerpos monoclonales, ya que pueden ser utilizados en pruebas de detección de antígenos de *T. solium*.
- La región de reconocimiento antigénico del mAb de captura acoplado a la partícula magnética no presentaron daño, se logró observar las bandas electroforéticas correspondientes al antígeno capturado.
- El ELISA basado en partículas magnéticas presentó una sensibilidad y especificidad de 100% en muestras de orina de pacientes con NCC subaracnoidea.
- El ELISA basado en partículas magnéticas detectó como positivos a 4 de los 27 pacientes con NCC calcificada.
- El ELISA basado en partículas magnéticas permitió discernir entre positivos y negativos con niveles bajos de antígenos circulantes del parásito.
- La sensibilidad de la prueba fue de 70.37% y la especificidad fue 42.86% en los casos con NCC calcificada.

## IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BERN, Caryn, et al. Magnitude of the disease burden from neurocysticercosis in a developing country. *Clinical Infectious Diseases*, 1999, vol. 29, no 5, p. 1203-1209.
- BERTH, Mario; BOSMANS, Eugene. Prevention of assay interference in infectious-disease serology tests done on the Liaison platform. *Clinical and Vaccine Immunology*, 2008, vol. 15, no 5, p. 891-892.
- BOTERO D, Restrepo M. *Parasitosis humanas*. Quinta Edición. Medellín, Colombia. Corporación para Investigaciones Biológicas, 2012, p. 467.
- BRANDT, J. R. A., et al., A monoclonal antibody-based ELISA for the detection of circulating excretory-secretory antigens in *Taenia saginata* cysticercosis. *International journal for parasitology*, 1992, vol. 22, no 4, p. 471-477.
- BUENO, Ednéia Casagrande, et al., Cellular immune response of patients with neurocysticercosis (inflammatory and non-inflammatory phases). *Acta tropica*, 2004, vol. 91, no 2, p. 205-213.
- BUENO, Edneia C., et al., Application of synthetic 8-kD and recombinant GP50 antigens in the diagnosis of neurocysticercosis by enzyme-linked immunosorbent assay. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 2005, vol. 72, no 3, p. 278-283.
- CASTRO-SESQUEN, Yagahira E., et al., Nanoparticle-Based Histidine-Rich Protein-2 Assay for the Detection of the Malaria Parasite *Plasmodium falciparum*. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 2016, vol. 95, no 2, p. 354-357.
- CHEN, J. P., et al., Determination of circulating antigen in cysticercosis patients using McAb-based ELISA. *Zhongguo ji sheng chong xue yu ji sheng chong bing za zhi= Chinese journal of parasitology & parasitic diseases*, 1991, vol. 9, no 2, p. 122-125.
- CORAL-ALMEIDA, Marco, et al. *Taenia solium* human cysticercosis: a systematic review of sero-epidemiological data from endemic zones around the world. *PLoS neglected tropical diseases*, 2015, vol. 9, no 7, p.1-20.

COROT, Claire, et al., Recent advances in iron oxide nanocrystal technology for medical imaging. *Advanced drug delivery reviews*, 2006, vol. 58, no 14, p. 1471-1504.

DEL BRUTTO, Oscar H. Neurocisticercosis: actualización en diagnóstico y tratamiento. *Neurología*, 2005, vol. 20, no 8, p. 412-418.

DEL BRUTTO, Oscar H. Neurocysticercosis: a review. *The Scientific World Journal*, 2012, vol. 2012, p. 1-8.

DEL BRUTTO, Oscar H. and GARCIA H. H. *Cysticercosis of the human nervous system*. Heidelberg New York Dordrecht London: Springer, 2014. 144 p. ISBN. 978-3-642-39021-0  
(a)

DEL BRUTTO, Oscar H. Neurocysticercosis. *The Neurohospitalist*, 2014, vol. 4, no 4, p. 205-212. (b)

DEL BRUTTO, Oscar H.; GARCÍA, Héctor H. *Taenia solium*: biological characteristics and life cycle. En *Cysticercosis of the Human Nervous System*. Springer, Berlin, Heidelberg, 2014. p. 11-21.(c)

ESTRADA, John J.; ESTRADA, Jane Almon; KUHN, Raymond E. Identification of *Taenia solium* antigens in cerebrospinal fluid and larval antigens from patients with neurocysticercosis. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 1989, vol. 41, no 1, p. 50-55.

ESTRADA, S. Sarria, et al., Neurocisticercosis. Hallazgos radiológicos. *Radiología*, 2013, vol. 55, no 2, p. 130-141.

FLEURY, Agnes, et al., Cisticercosis en el ser humano. *Cisticercosis Guía para Profesionales de la Salud*. Coords. Carlos Larralde y Aline S. de Aluja. Fondo de Cultura Económica, Secretaría de Salud, Instituto Nacional de Salud Pública, Fundación Mexicana para la Salud, 2006, p. 41-51.

FLEURY, Agnès, et al., Neurocysticercosis: HP10 antigen detection is useful for the follow-up of the severe patients. *PLoS neglected tropical diseases*, 2013, vol. 7, no 3, p. e2096.



FLISSER, A., et al., FAO/WHO/OIE Guidelines for the Surveillance, Prevention and Control of Taeniosis/cysticercosis. Paris: World Organization for Animal Health, 2005, 139 p. ISBN: 92-9044-656-0

FODDAI, Antonio; ELLIOTT, Christopher T.; GRANT, Irene R. Maximizing capture efficiency and specificity of magnetic separation for *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* cells. Applied and environmental microbiology, 2010, vol. 76, no 22, p. 7550-7558.

GARCÍA, H. H. Epidemiology of *Taenia solium* infection in Peru. Parasitology International, 1998, no 47, p. 29.

GARCÍA, H. H., et al. Teniasis/cisticercosis por *Taenia solium*, un serio problema de salud pública en el Perú. Lima: Ministerio de Salud del Perú, 2001, p. 1-63.

GARCÍA, H. H., et al. *Taenia solium* cysticercosis. The lancet, 2003, vol. 362, no 9383, p. 547-556. (a)

GARCÍA, H. H.; DEL BRUTTO, Oscar H. Imaging findings in neurocysticercosis. Acta tropica, 2003, vol. 87, no 1, p. 71-78. (b)

GARCÍA, H. H., et al., Neurocysticercosis: updated concepts about an old disease. The Lancet Neurology, 2005, vol. 4, no 10, p. 653-661.

GARCÍA, H. H., et al., Epidemiology and control of cysticercosis in Peru. Revista peruana de medicina experimental y salud pública, 2010, vol. 27, no 4, p. 592-597.

GARCÍA, H. H.; NASH, Theodore E.; DEL BRUTTO, Oscar H. Clinical symptoms, diagnosis, and treatment of neurocysticercosis. The Lancet Neurology, 2014, vol. 13, no 12, p. 1202-1215.

GARG, Ravindra Kumar. Single enhancing computerized tomography-detected lesion in immunocompetent patients. Neurosurgical focus, 2002, vol. 12, no 6, p. 1-9.

HARRISON, L. J. S., et al., Specific detection of circulating surface/secreted glycoproteins of viable cysticerci in *Taenia saginata* cysticercosis. Parasite immunology, 1989, vol. 11, no 4, p. 351-370.

- HERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, Ana, et al. Comparison of T24H-his, GST-T24H and GST-Ts8B2 recombinant antigens in western blot, ELISA and multiplex bead-based assay for diagnosis of neurocysticercosis. *Parasites & vectors*, 2017, vol. 10, no 1, p. 237.
- IMIRIZALDU, L., et al. Neurocysticercosis: Una enfermedad emergente. En *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*. Gobierno de Navarra. Departamento de Salud, 2004. p. 201-209.
- KIMURA-HAYAMA, Eric T., et al., Neurocysticercosis: radiologic-pathologic correlation. *Radiographics*, 2010, vol. 30, no 6, p. 1705-1719.
- KOURILOV, Vitaly; STEINITZ, Michael. Magnetic-bead enzyme-linked immunosorbent assay verifies adsorption of ligand and epitope accessibility. *Analytical biochemistry*, 2002, vol. 311, no 2, p. 166-170.
- KUNGU, Joseph M., et al. Sero-prevalence of *Taenia* spp. cysticercosis in rural and urban smallholder pig production settings in Uganda. *Acta tropical*, 2017, vol. 165, p. 110-115.
- KYVSGAARD, Niels C.; JOHANSEN, Maria Vang; CARABIN, Hélène. Simulating transmission and control of *Taenia solium* infections using a Reed-Frost stochastic model. *International journal for parasitology*, 2007, vol. 37, no 5, p. 547-558.
- LACLETTE, J. P., et al., The coexistence of *Taenia solium* cysticerci and the pig: role of the antigen B. *Acta Leidensia*, 1989, vol. 57, no 2, p. 115-122.
- LACLETTE, J. P., et al., Paramyosin inhibits complement C1. *The Journal of Immunology*, 1992, vol. 148, no 1, p. 124-128.
- LARRALDE, Carlos; ALUJA, Aline S. de. *Cisticercosis: guía para profesionales de la salud*. 2006. 245 p. ISBN 968-16-8138-X
- LEÓN, Nancy, et al. Cisteínoproteasas Cathepsinas L de *Taenia solium*: Rol biológico en la infección y potencial uso para el inmunodiagnóstico de la neurocysticercosis. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 2013, vol. 30, p. 446-454.

LI, C. W., et al., Detection of urine antibodies to *Schistosoma japonicum* by magnetic particle affinity immunoassay. *Zhongguo xue xi chong bing fang zhi za zhi*= Chinese journal of schistosomiasis control, 2011, vol. 23, no 3, p. 327-329.

MATEO, Cesar, et al., Increase in conformational stability of enzymes immobilized on epoxy-activated supports by favoring additional multipoint covalent attachment☆. *Enzyme and Microbial Technology*, 2000, vol. 26, no 7, p. 509-515.

MEZA-LUCAS, Antonio; REBOLLEDO, Francisco Aguilar. Teniasis humana por *Taenia solium*. *Revista Latinoamericana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio*, 2002, vol. 49, no 2, p. 92-99.

MONTERO DÍAZ, Yadith Amparo y ROJAS RIOS, Randy, "Estudio retrospectivo de la seroprevalencia de neurocisticercosis en Colombia dentro del periodo de enero de 1995 a diciembre de 2005: programa de vigilancia por el Laboratorio Instituto Nacional de Salud". Asesora: Dra. Carmen Inés Mora. Tesis de Licenciatura. Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias, Carrera de Bacteriología. Bogotá, 2006.

OBREGÓN-HENAO, Andrés, et al., In situ detection of antigenic glycoproteins in *Taenia solium* metacestodes. *Journal of Parasitology*, 2003, vol. 89, no 4, p. 726-732.

OTRA, M. Diagnóstico de las teniasis intestinales. Programa de Control de Calidad, SEIMC. Servicio de Microbiología, 2002. p. 1-9.

PALACIOS, Enrique; LUJAMBIO, Perla Salgado; JASSO, Rafael Rojas. Computed tomography and magnetic resonance imaging of neurocysticercosis. En *Seminars in roentgenology*. WB Saunders, 1997. p. 325-334.

PAREDES, Adriana, et al., Anti-*Taenia solium* monoclonal antibodies for the detection of parasite antigens in body fluids from patients with neurocysticercosis. *Experimental parasitology*, 2016, vol. 166, p. 37-43.

PLANCARTE, A.; FLISSER, A.; LARRALDE, C. Fibronectin-like properties in antigen B from the cysticercus of *Taenia solium*. *Cytobios*, 1983, vol. 36, no 142, p. 83-93.

PONCE ALMERÍ, Reynaldo. "Caracterización enzimática de una enolasa recombinante de *T. solium* y su potencial uso como antígeno inmunodiagnóstico de neurocisticercosis". Asesor: PhD. Mirko Zimic. Tesis Grado Magister. UPCH, Escuela de Posgrado, Lima, 2017.

RAMOS GOMEZ, Milagros; CASTILLO, Claudia G. Aplicaciones biomédicas de las nanopartículas magnéticas. Ideas CONCYTEG, 2011, vol. 72, no 6, p. 630-649.

RIVERA, Diego Miguel; PUENTES, Sofía; CABALLERO, Ligia. Resonancia magnética cerebral: secuencias básicas e interpretación. Universitas Médica, 2011, vol. 52, no 3, p. 292-306.

RODRÍGUEZ Silvia et al., Immunological and molecular diagnosis of cysticercosis. Pathogens and global health, 2012, vol.106, no 5, p.286–298.

RODRÍGUEZ, Silvia, et al. Detection of *Taenia solium* antigens and anti-*T. solium* antibodies in paired serum and cerebrospinal fluid samples from patients with intraparenchymal or extraparenchymal neurocysticercosis. The Journal of infectious diseases, 2009, vol. 199, no 9, p. 1345-1352.

SAAVEDRA, Herbert, et al., Diagnóstico y manejo de la neurocisticercosis en el Perú. Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública, 2010, vol. 27, p. 586-591.

SAFARIK, Ivo; SAFARIKOVA, Mirka. Use of magnetic techniques for the isolation of cells. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, 1999, vol. 722, no 1-2, p. 33-53.

SAFARIK, Ivo; SAFARIKOVA, Mirka. Magnetic nano-and microparticles in biotechnology. Chemical Papers, 2009, vol. 63, no 5, p. 497-505.

SAJID, Mohammed; MCKERROW, James H. Cysteine proteases of parasitic organisms. Molecular and biochemical parasitology, 2002, vol. 120, no 1, p. 1-21.

SALL, Anna, et al., Advancing the global proteome survey platform by using an oriented single chain antibody fragment immobilization approach. New biotechnology, 2016, vol. 33, no 5, p. 503-513.

SINGH, Gagandeep, et al., Cysticercus immunoblot assay in patients with single, small enhancing lesions and multilesional neurocysticercosis. The Journal of the Association of Physicians of India, 1999, vol. 47, no 5, p. 476-479.

TSANG, Victor CW; BRAND, Joy A.; BOYER, Anne E. An enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay and glycoprotein antigens for diagnosing human cysticercosis (*Taenia solium*). Journal of Infectious Diseases, 1989, vol. 159, no 1, p. 50-59.

VAN KERCKHOVEN, I., et al., Improved detection of circulating antigen in cattle infected with *Taenia saginata* metacestodes. Veterinary Parasitology, 1998, vol. 76, no 4, p. 269-274.

VIDAL, Estañol, et al., Integridad de la barrera hematoencefálica y síntesis intratecal de Ig G en cisticercosis parenquimatosa y subaracnoidea. La Revista de Investigación Clínica 1989 Vol. 41, no 4, p.327-330.

WHITE, A. Clinton; ROBINSON, P.; KUHN, R. *Taenia solium* Cysticercosis: Host-Parasite Interactions and the Immune Response. En Immunopathogenetic aspects of disease induced by helminth parasites. Karger Publishers, 1997. p. 209-230.

WHITE JR, A. Clinton. Neurocysticercosis: updates on epidemiology, pathogenesis, diagnosis, and management. Annual review of medicine, 2000, vol. 51, no 1, p. 187-206.

YAKOLEFF-GREENHOUSE, Veronica, et al., Analysis of antigenic variation in cysticerci of *Taenia solium*. The Journal of parasitology, 1982, p. 39-47.

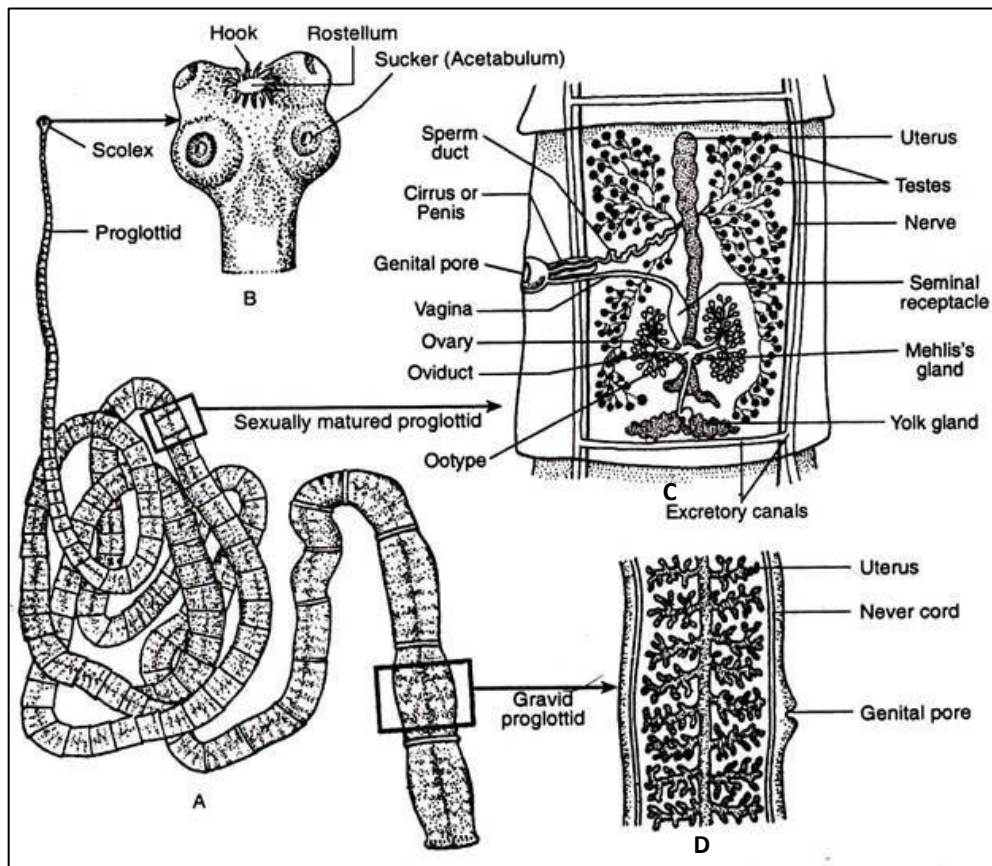
YOSHINO, K., et al., On the evacuation of eggs from the detached gravid proglottids of *Taenia solium* and on the structure of its eggs. Taiwan Igakkai Zasshi= Journal of the Medical Association of Formosa, 1934, vol. 33, no 1.

YU, Qin, et al., Magnetic affinity enzyme-linked immunoassay for diagnosis of *schistosoma japonicum* in persons with low-intensity infection. The American journal of tropical medicine and hygiene, 2012, vol. 87, no 4, p. 689-693.

ZAMORA, Humberto, et al., Drop in antigen levels following successful treatment of subarachnoid neurocysticercosis. En American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 8000 WESTPARK DR, STE 130, MCLEAN, VA 22101 USA: AMER SOC TROP MED & HYGIENE, 2005. p. 41-41.

ZIMIC, Mirko, et al. Immunoinformatics prediction of linear epitopes from *Taenia solium* TSOL18. Bioinformation, 2011, vol. 6, no 7, p. 271.

## X. ANEXOS

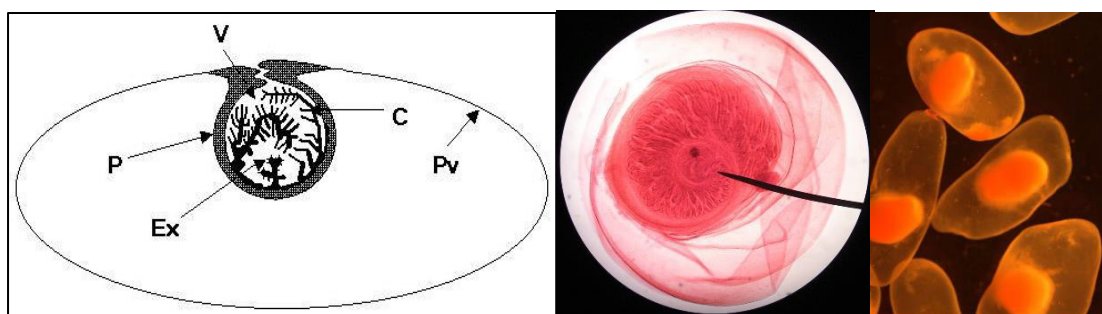


Anexo 1. Morfología del estadio adulto de *T. solium*. A: estróbilo o cuerpo. B: Cabeza o escólex. C: Proglótido maduro D: Proglótido grávido. Fuente: Online platform Biology discussion. Khusboo Jain, 2015.

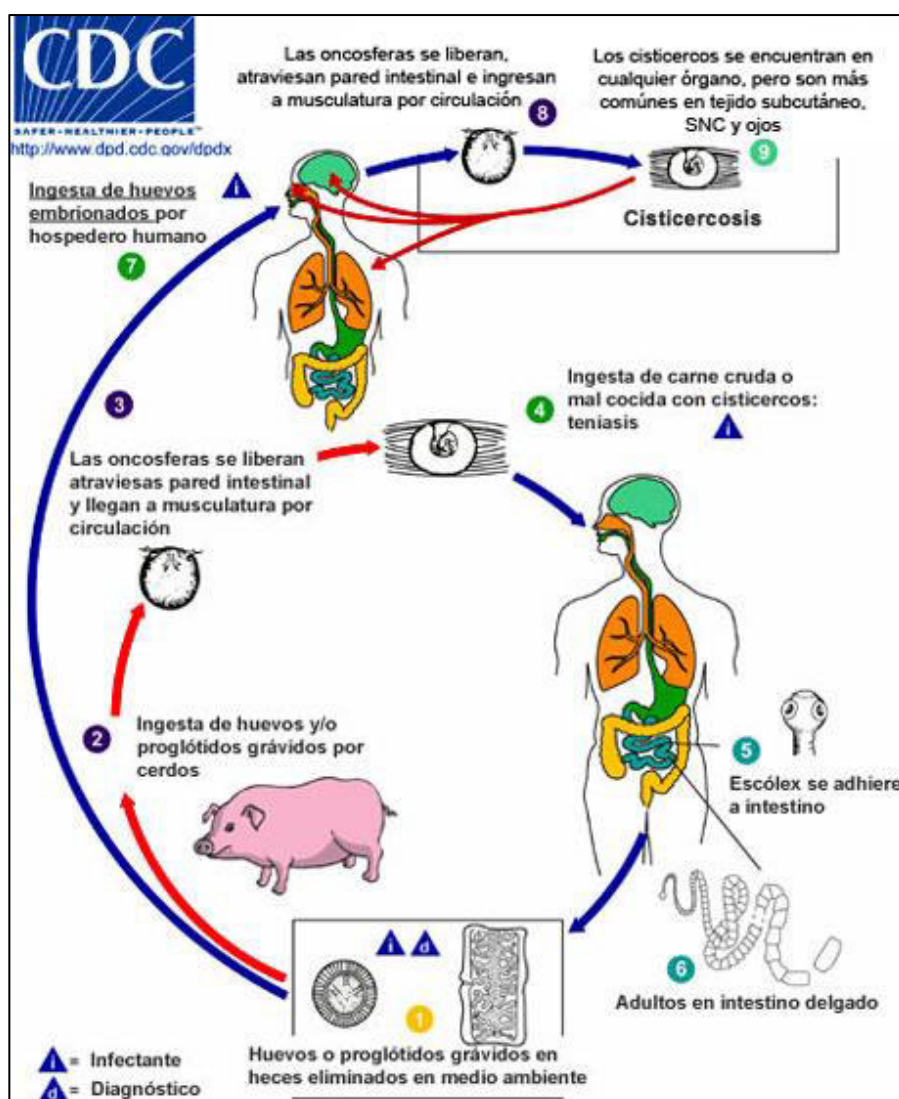
Disponible en: <http://www.biologydiscussion.com/invertebrate-zoology/phylum-platyhelminthes/an-example-of-phylum-platyhelminthes-taenia-solium/32860>



Anexo 2. Huevo de *Taenia spp.* Donde se observa el embrión hexacanto y el embrióforo característico. Fuente: Meza et al., 2002.



Anexo 3. Esquema de la larva o cisticerco de *T. solium*. C: canal espiral, Ex: escólex, P: pared vestibular, Pv: pared vesicular y V: espacio vestibular. Fuente: Solis *et al.*, 2004.

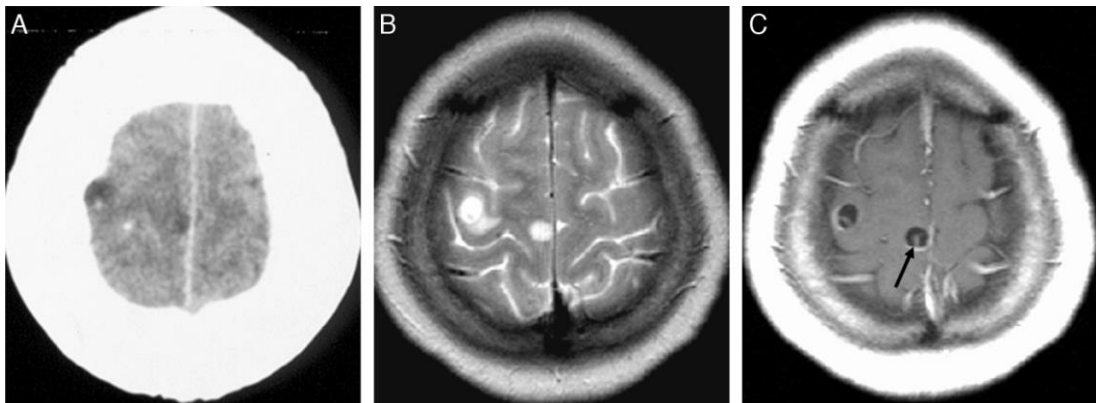


Anexo 4. Ciclo biológico de *Taenia solium*. Fuente: Centers for disease control and prevention, Parasites, Teniasis, Biology, Life Cycle 2013 [www.dpd.cdc.gov/dpdx](http://www.dpd.cdc.gov/dpdx).

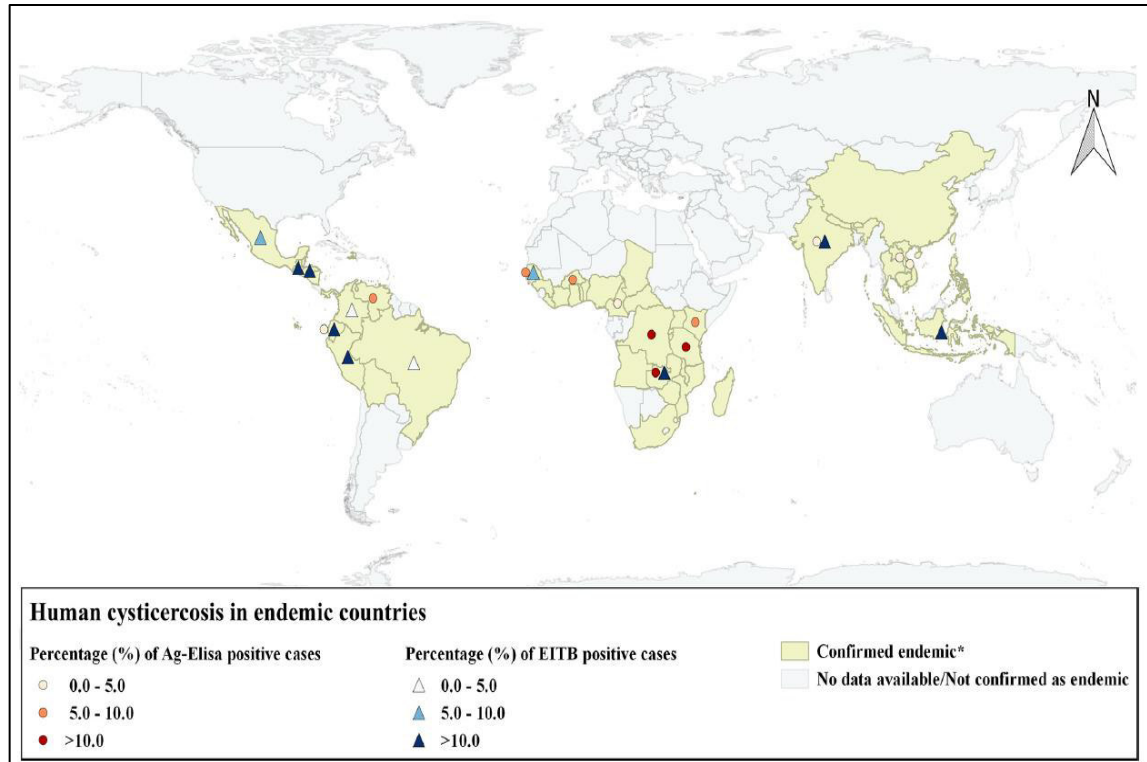




Anexo 5. Cisticercos subaracnoideos. Quiste gigante originado de la cisura de Silvio (flecha). Fuente: García *et al.*, 2003b.



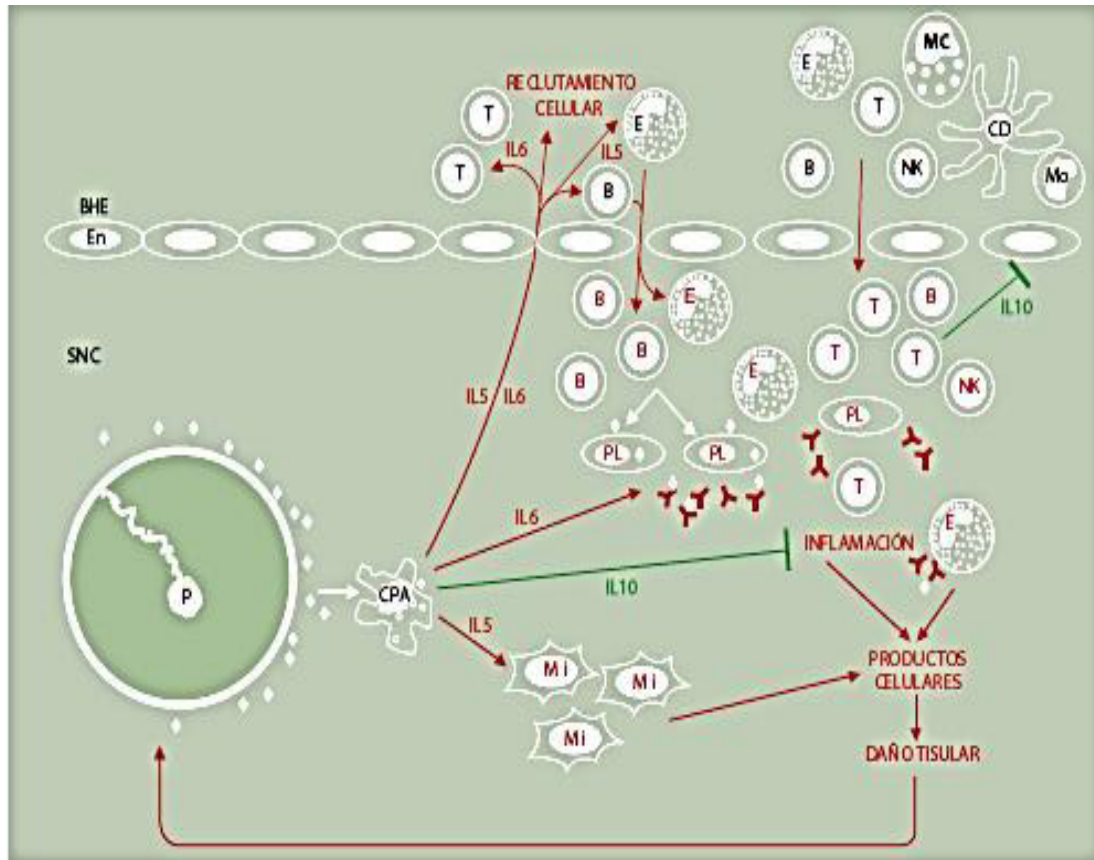
Anexo 6. Cisticercos parenquimatosos. Tomografía computarizada con contraste (A) y Resonancias magnéticas (B y C). Se observan pequeñas lesiones quísticas corticales frontales derechas, con mínimo edema perilesional, realce anular y escólex visible en su interior (flecha). Fuente: Estrada *et al.*, 2013.



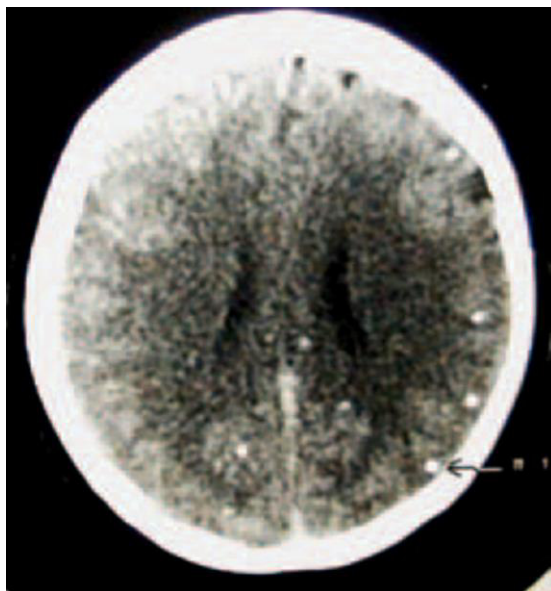
Anexo 7. Distribución global de la Cisticercosis, basada en estudios epidemiológicos de ELISA Antígeno y/o EITB. Fuente: Coral- Almeida *et. al* 2015.



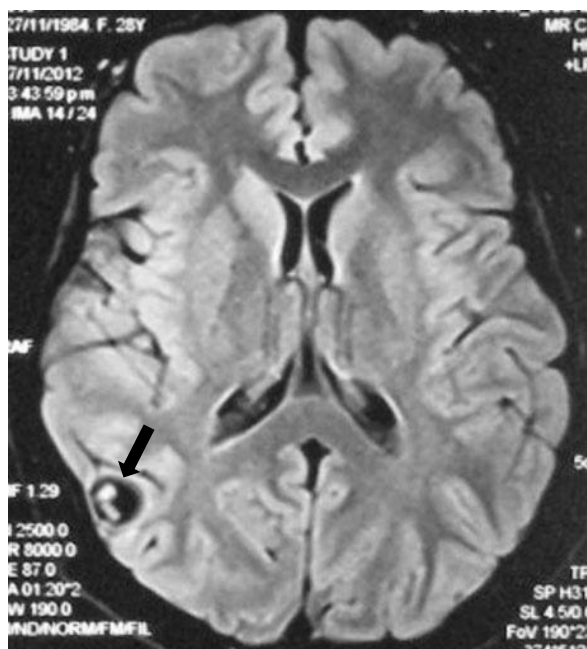
Anexo 8. Principales áreas endémicas para teniasis/cisticercosis por *T. solium* en el Perú. Fuente: García *et al.*, 2001.



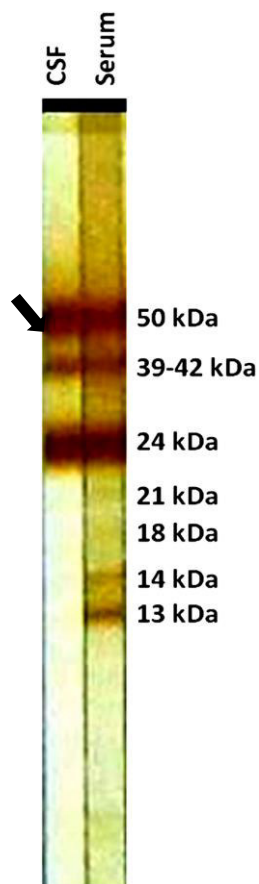
Anexo 9. Posibles relaciones hospedero-parásito. Con el establecimiento del cisticerco se desencadena una respuesta inflamatoria asociada a la neurocisticercosis sintomática. Se muestran algunas de las moléculas participantes en este fenómeno y algunas de sus posibles implicaciones; en rojo se resalta el efecto inflamatorio y en verde el regulador. (BHE: barrera hematoencefálica; SNC: sistema nervioso central; P: parásito; En: endotelio; CPA: célula presentadora de antígenos; T: linfocitos T; B: linfocitos B; PL: célula plasmática; E: eosinófilos; Mi: microglia; NK: natural killer; CD: célula dendrítica; Mo: monocito; MC: mastocito.) Fuente: Larralde y Aluja 2006.



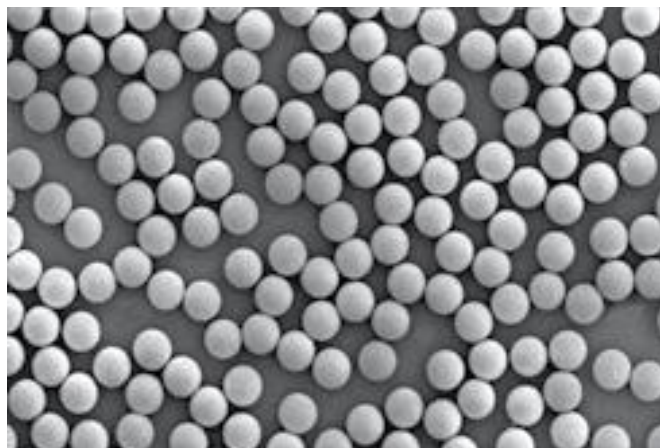
Anexo 10. Múltiples calcificaciones. TAC en fase simple. Múltiples imágenes nodulares hiperdensas localizadas en el espacio subaracnoideo (Flecha). Fuente: Fleury *et al.*, 2006.



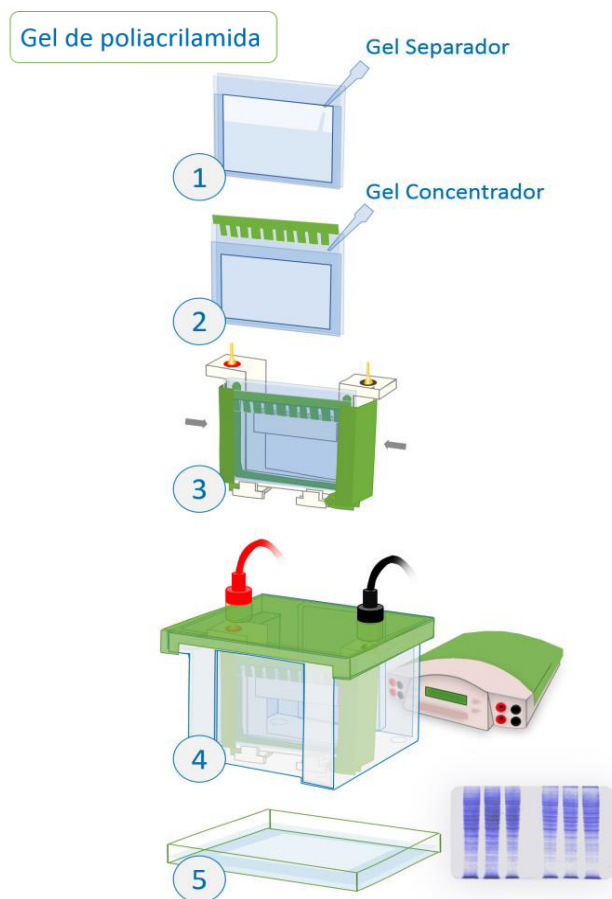
Anexo 11. RM donde se observan cisticercos cerebrales parenquimatosos en la etapa vesicular ubicada en el lóbulo parietal derecho. El escólex se visualiza claramente dentro del quiste (Flecha). Fuente: García y Del Brutto, 2003b.



Anexo 12. LLGP-EITB. La presencia de cualquiera de las siete bandas diagnósticas (flecha) define un resultado positivo. Además, se observa la diferencia entre los niveles de anticuerpo en Fluido cerebroespinal (CSF) y suero de un mismo paciente expresadas en el número de bandas diferenciadas en cada tira reactiva (Fuente: Rodríguez *et al.*, 2012).



Anexo 13. Microscopia electrónica de barrido de Partículas magnéticas. Fuente: Adaptado de <https://www.thermofisher.com/pe/en/home/brands/product-brand/dynal/dynabeads-technology.html>



Anexo 14. Procedimiento de una electroforesis SDS- PAGE. 1. Preparación del gel "resolving". 2. Preparación del gel "stacking" o concentrador. 3. Se abrocha el cassette en los electrodos, se coloca el buffer de corrida y se carga la muestra 4. Se coloca la tapa, se conecta y se programa a la fuente de poder. 5. Se retira el gel y se tiñe.

Fuente: <http://conogasi.org/articulos/metodo-gel-de-poliacrilamida-para-proteinas/>



## Consentimiento Informado

– Adultos / Fase I –

**Estudio:** Estudio transversal para detectar casos de neurocisticercosis subaracnoidea a nivel comunitario

**Investigadores:** Héctor H. García, Luz Maria Moyano, Seth O'Neal

**Institución:** Universidad Peruana Cayetano Heredia y Oregon Health & Sciences University (USA)

### INTRODUCCION

Este es un estudio desarrollado por investigadores de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, de la Universidad de Salud y Ciencias de Oregon (EEUU) y otras instituciones. Estamos realizando este estudio para desarrollar nuevas pruebas para diagnosticar una enfermedad llamada cisticercosis (mal llamada triquina del cerdo). Esta enfermedad es causada por un parásito que entra en el cerebro y causa convulsiones y fuertes dolores de cabeza. Estamos haciendo este estudio en esta zona, porque queremos mejorar una prueba de orina que pueda detectar personas con esta enfermedad. Esta enfermedad es muy frecuente en esta area. Cerca de 30,000 personas participarán en este estudio.

### PROCEDIMIENTOS.

Si usted decide participar le haremos unas preguntas acerca de usted, su casa y su familia. Esta entrevista durará media hora. También le solicitaremos un pequeño volumen de orina (50 ml, alrededor de un cuarto de taza) para evaluar si puede tener el parásito. Si el resultado de la prueba de orina es positivo, se lo invitará a participar en una segunda fase de este estudio. En la segunda fase, tendrá una evaluación neurológica y una prueba de resonancia magnética de su cerebro, que toma una imagen de su cerebro para descartar la cisticercosis.

### BENEFICIOS.

Si tiene un resultado positivo en su prueba de orina, puede tener el parásito en su cerebro. En ese caso, se lo invitará a participar en la segunda fase del estudio y se le realizará una evaluación neurológica y una imagen de resonancia magnética para descartar cisticercosis. Todos los exámenes que son parte del estudio se le proporcionarán de forma gratuita.

### RIESGOS Y MOLESTIAS

La entrevista podría incomodarlo un poco. No esperamos otros riesgos o molestias en esta fase.

### PARTICIPACION VOLUNTARIA.

Usted no tiene que participar en este estudio si no desea. Usted puede decidir no participar de este estudio o puede decidir retirarse en cualquier momento del estudio. Esta decisión no afectará su cuidado médico ni otros beneficios.

### CONFIDENCIALIDAD.

Su nombre será mantenido en privado (confidencial). Nosotros registraremos su nombre y su dirección en una lista, para poder comunicarle posteriormente los resultados. Los formatos con información del estudio tendrán un código, el cual estará ligado a su



**APROBADO**

F. APROBACIÓN 23/04/18

nombre. Sólo el personal de salud y los investigadores de este estudio tendrá acceso a esta lista de nombres.

#### **PREGUNTAS.**

Si usted tiene alguna pregunta sobre este estudio, por favor contacte a la Dra. Luz María Moyano (Celular 997595165, Teléfono 252 6857- Tumbes) o al Dr. Héctor Hugo García L. (Celular 993505197, Teléfono 01-3284038 – Lima).

#### **ASPECTOS ETICOS**

Si usted tiene alguna pregunta sobre sus derechos como participante voluntario de este estudio, o si usted piensa que ha sido perjudicado por participar en este estudio por favor contacte a la presidenta del Comité Institucional de Ética de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, Dra. Frine Samalvides Cuba, al teléfono (01) 3190000 ext. 201355 o al correo electrónico [duict.cieh@oficinas-upch.pe](mailto:duict.cieh@oficinas-upch.pe). Nosotros le entregaremos una copia de este formato de consentimiento.

Nosotros queremos almacenar las muestras obtenidas en este estudio durante diez años. Estas muestras no tendrán nombre en ellas. Solo serán identificados por códigos. Estas muestras podrían ser usadas más tarde para probar otros métodos de diagnóstico para cisticercosis u otras enfermedades. El investigador principal será responsable de estas muestras. Si no quiere darnos su permiso para almacenar las muestras, la porción no utilizada será desechada y usted todavía puede participar en el estudio.

Autorizo que mis muestras se almacenen para futuros estudios      Sí \_\_\_\_ No \_\_\_\_

He leído este formato de consentimiento o alguien me lo ha explicado. Yo, accedo libremente a participar de este estudio.

\_\_\_\_\_  
Nombre y Firma o Huella digital del Participante      Fecha

\_\_\_\_\_  
Nombre y Firma del testigo (si el paciente es iletrado)      Fecha

\_\_\_\_\_  
Nombre y Firma del investigador      Fecha





**Protocolo de ELISA con partículas magnéticas M-270 Acido carboxílico conjugados a anticuerpos monoclonales TsW8 en muestras de orina**

1. Adicionar 0.0063mg de partículas magnéticas conjugadas a un vial que contenga 500ul de PBS Tween 0.05%
2. Lavar 2 veces con 500ul de PBS Tween 0.05% con la ayuda del soporte magnético.
3. Bloquear con 500 ul de PBS Tween 0.05% leche anchor 2% e incubar por 1 hora y 30 minutos a temperatura ambiente en constante rotación.
4. Descartar el contenido del tubo y lavar 2 veces con PBS tween 0.05%.
5. Añadir 1 ml de orina e incubar overnight a 4°C en rotación lenta.
6. Al día siguiente, atemperar por 10 minutos a temperatura ambiente en rotación lenta.
7. Lavar 4 veces con 500ul de PBS Tween 0.05%
8. Agregar 100 ul de Tsw5 biotinilado [1ug] e incubar 1 hora y 30 minutos a 37°C en agitación lenta.
9. Lavar 4 veces con 500ul de PBS Tween 0.05%
10. Añadir 250 ul de estreptavidina HRP 1/10000 e incubar 15 minutos a 37°C en agitación lenta.
11. Lavar 4 veces con 500ul de PBS Tween 0.05%
12. Añadir 100 ul de TMB por tubo y traspasar inmediatamente a la placa NUNC F.
13. Incubar en oscuridad y agitación lenta por 5 minutos a temperatura ambiente.
14. Añadir 50ul solución de parada ( $\text{H}_2\text{SO}_4$  2N)
15. Inmediatamente separar 150ul de cada pozo con la ayuda del soporte magnético a otros pozos y leer a 450nm.

## Anexo 17

### **Protocolo de ELISA con partículas magnéticas M-270 epoxy conjugados a anticuerpos monoclonales TsW8 en muestras de orina**

1. Adicionar 0.0063mg de partículas magnéticas conjugadas a un vial que contenga 500ul de PBS Tween 0.05%
2. Lavar 2 veces con 500ul de PBS Tween 0.05% con la ayuda del soporte magnético.
3. Bloquear con 500 ul de PBS Tween 0.05% leche anchor 2% por tubo e incubar por 1 hora y 30 minutos a temperatura ambiente en constante rotación.
4. Descartar el contenido del tubo y lavar 2 veces con PBS tween 0.05%.
5. Añadir 1ml de orina e incubar overnight a 4°C en rotación lenta.
6. Al día siguiente, atemperar por 10 minutos a temperatura ambiente en rotación lenta.
7. Lavar 4 veces con 500ul de PBS Tween 0.05%
8. Agregar 100 ul de Tsw5 biotinilado [0.25ug] e incubar 1 hora y 30 minutos a 37°C en agitación lenta.
9. Lavar 4 veces con 500ul de PBS Tween 0.05%
10. Añadir 250 ul de estreptavidina-HRP 1/10000 e incubar 15 minutos a 37°C en agitación lenta.
11. Lavar 4 veces con 500ul de PBS Tween 0.05%
12. Añadir 100 ul de TMB por tubo y traspasar inmediatamente a la placa NUNC F.
13. Incubar en oscuridad y agitación lenta por 5 minutos a temperatura ambiente.
14. Añadir 50ul solución de parada ( $\text{H}_2\text{SO}_4$  2N).
15. Inmediatamente separar 150ul de cada pozo con la ayuda del soporte magnético a otros pozos y leer a 450nm.